

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Frecuencia de infección con *Actinobacillus
pleuropneumoniae* en granjas porcinas tecnificadas de
Arequipa, Lima, Ica y La Libertad**

TESIS

para optar el título de Médico Veterinario

AUTORA

Lorena Indira Mori Álvarez

Lima-Perú

2007

A mis padres, por su infinito amor
e incondicional apoyo

A la Dra. Sonia Calle Espinoza por darme la oportunidad
de realizar este trabajo, por sus constantes consejos
y estímulos para seguir creciendo profesionalmente.

A mis asesores; Chris, Marlon y al Dr. Néstor Falcón
por sus valiosas sugerencias y aportes
durante el desarrollo de este trabajo.

A mis padres por brindarme un hogar cálido
y enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo
son el camino para lograr objetivos.

A mis hermanos por confiar en mí.

A mis queridas amigas de la universidad
por su continuo interés y afectuoso aliento.

Y a todas las personas que de una manera u otra
permitieron que esta tesis se desarrolle.

TABLAS DE CONTENIDO

RESUMEN.....	vi
SUMMARY.....	vii
LISTA DE CUADROS.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Antecedentes.....	3
2.2 Características generales de la bacteria.....	3
2.3 Factores de virulencia.....	5
2.3.1 Cápsula.....	5
2.3.2 Lipopolisacáridos.....	5
2.3.3 Fimbrias.....	6
2.3.4 Proteínas de membrana externa.....	6
2.3.5 Proteínas de unión a transferrina.....	7
2.3.6 Proteasas.....	7
2.3.7 Superóxidodismutasas.....	8
2.3.8 Ureasa.....	8
2.3.9 Toxinas.....	8
2.4 Epidemiología.....	10
2.4.1 Agente.....	10
2.4.2 Hospederos.....	11
2.4.3 Modo de transmisión.....	11
2.4.4 Pleuroneumonía porcina.....	12
2.4.5 Factores predisponentes para el desarrollo de la pleuroneumonía porcina.....	13
2.4.6 Impacto económico.....	13
2.5 Patogenia.....	14
2.6 Inmunidad.....	15
2.6.1 Inmunidad humoral.....	16
2.6.2 Inmunidad celular.....	17
2.6.3 Inmunidad maternal.....	18
2.7 Signos clínicos y lesiones.....	18
2.8 Diagnóstico.....	20
2.8.1 Pruebas de laboratorio para la detección de anticuerpos.....	21

2.8.1.1 Fijación de complemento (FC).....	21
2.8.1.2 Inhibición de la hemolisina (IH).....	21
2.8.1.3 Aglutinación en placa.....	22
2.8.1.4 Ensayo de inmunoabsorción unido a enzimas (ELISA) indirecto.....	22
2.8.2 Pruebas de laboratorio para la detección de antígenos.....	24
2.8.2.1 Coaglutinación.....	24
2.8.2.2 Inmunohistoquímica.....	24
2.8.3 Pruebas de laboratorio para la detección de ADN.....	24
2.8.3.1 Reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	24
2.8.3.2 Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE).....	25
2.8.3.3 Ribotipificación.....	25
2.8.4 Diagnóstico diferencial.....	26
2.9 Tratamiento.....	26
2.10 Prevención y control.....	28
2.10.1 Vacunas.....	31
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
3.1 Lugar de estudio.....	34
3.2 Animales y tamaño de muestra.....	34
3.3 Materiales.....	34
3.4 Recolección de muestras.....	35
3.5 Procesamiento de las muestras.....	35
3.5.1 Procedimiento del análisis.....	36
3.5.1.1 Reactivos.....	36
3.5.1.2 Preparación de los reactivos y muestras.....	36
3.5.1.3 Distribución e incubación de las muestras y controles.....	36
3.5.1.4 Adición e incubación del conjugado.....	37
3.5.1.5 Adición e incubación del sustrato.....	37
3.5.1.6 Adición de la solución de frenado.....	37
3.5.1.7 Lectura y calculo de los resultados.....	37
3.5.1.8 Interpretación de los resultados.....	38
3.6 Análisis de datos.....	38
IV. RESULTADOS.....	39
V. DISCUSIÓN.....	42
VI. CONCLUSIONES.....	47
VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	48

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Porcentaje de muestras seropositivas a *Actinobacillus pleuropneumoniae* según zonas.

Cuadro 2: Porcentaje de muestras seropositivas a *Actinobacillus pleuropneumoniae* según etapa productiva.

Cuadro 3: Porcentaje de muestras seropositivas a *Actinobacillus pleuropneumoniae* por la técnica de ELISA indirecta, en las diez granjas muestreadas. (n= 30 animales por granja)

Cuadro 4: Porcentaje de muestras seropositivas a *Actinobacillus pleuropneumoniae* según zona y etapa productiva.

Cuadro 5: Porcentaje de muestras seropositivas a *Actinobacillus pleuropneumoniae* según la edad de los animales.

RESUMEN

La pleuropneumonía porcina ocasionada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, es una de las enfermedades respiratorias que ocasiona cuantiosas pérdidas económicas en la industria porcina a nivel mundial. El presente estudio tuvo como objetivo determinar la frecuencia de anticuerpos contra la toxina ApxIV de *A. pleuropneumoniae*, causante de pleuroneumonía porcina en granjas porcinas tecnificadas de los departamentos de Arequipa, Lima, Ica y La Libertad. Se tomaron muestras de sangre de 300 animales de las etapas de crecimiento y acabado. Se utilizó la prueba de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos contra la toxina ApxIV de *A. pleuropneumoniae*. El 23.7 % (71/300) de los animales presentaron anticuerpos contra la toxina ApxIV de *A. pleuropneumoniae*, correspondiendo la mayor frecuencia al departamento de Ica con un 60 %. La presencia de anticuerpos contra la toxina ApxIV evidencia la infección con esta bacteria. Por lo tanto, se confirma la presencia de la infección con *A. pleuropneumoniae* en la industria porcina del Perú.

Palabras claves: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, pleuroneumonía porcina, toxina Apx IV, ELISA indirecta.

SUMMARY

The Porcine pleuropneumonia due to *Actinobacillus pleuropneumoniae* is one of the respiratory diseases that causes large economic losses in swine production worldwide. This study had as objective to determinate the frequency of antibodies against the ApxIV toxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, cause of porcine pleuropneumonia in commercial swine farms from the departments of Arequipa, Lima, Ica and La Libertad. Samples were taken from 300 animals from grower and finisher stages. The indirect ELISA test was employed for the detection of antibodies against the ApxIV toxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. 23.7 % (71/300) of the animals contained antibodies against the ApxIV toxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, the highest frequency was found in Ica, with 60%. The presence of antibodies against the ApxIV toxin demonstrates the presence of infection with this bacterium. Thus, the presence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in swine commercial farms in Peru are confirmed.

Palabras claves: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, porcine pleuropneumonia, ApxIV toxin, indirect ELISA.

I. INTRODUCCIÓN

La población de ganado porcino según las últimas estimaciones oficiales están alrededor de 2'995,000 cabezas, con una producción de carne de 87,721 toneladas (Dirección General de Información Agraria – 2004) colaborando con el 47% de la producción de carne a nivel nacional (Dirección General de Información Agraria – 2005). La producción de carne de porcino ha tenido un incremento en los últimos años, en el 2004 la producción aumentó a 97.96 TM, en el 2005 a 102.90 TM y en el 2006 a 108.65 TM, lo que refleja un buen desarrollo de la actividad a nivel nacional. Teniendo como referencia el año 2001, el consumo per cápita de carne de porcino ha tenido un ligero aumento de 3.6 a 3.91kg/hab/año (Dirección General de Información Agraria – 2006).

La industria porcina se ve afectada por problemas de origen sanitario, siendo uno de los principales las enfermedades respiratorias, vistas en la forma de neumonía y pleuritis, ya sean de origen bacteriano o viral. La presencia de estos agentes patógenos en las granjas tiene un gran efecto en los indicadores de producción, ocasionando disminución en la tasa de crecimiento, en la ganancia diaria, en la conversión alimenticia, en el consumo y peso de los porcinos al mercado.

Como ejemplo tenemos a la pleuroneumonía porcina (PP) producida por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, una de las enfermedades de mayor impacto económico asociadas al complejo respiratorio porcino, con graves pérdidas económicas atribuidas principalmente a la elevada mortalidad, costos de medicación y disminución en la tasa de crecimiento. Los activos intercambios comerciales, la intensificación y

masificación en las explotaciones porcinas predisponen la extensión de la pleuroneumonía porcina, incrementando el significativo impacto económico de esta enfermedad. Investigaciones realizadas en Estados Unidos estiman que las pérdidas económicas alcanzan los 200 a 300 millones de dólares (Estrada, 1996).

En el Perú, Calle y Camacho en el año 1988 (Calle, comunicación personal) aislaron por primera vez *A. pleuropneumoniae* en el departamento de Trujillo. Posteriormente, Calle *et al.* (1996), detectaron anticuerpos contra los serotipos 1, 3, 5, y 7 de *A. pleuropneumoniae* en granjas porcinas de Lima, usando la prueba de aglutinación en placa; en el mismo año Castillo (1996), realizó el aislamiento y serotipificación de *A. pleuropneumoniae* de un total de 200 muestras de suero sanguíneo e hisopados de pulmón tomadas en un camal de Lima; confirmando de esta manera la presencia de *A. pleuropneumoniae*. Lo que justifica la realización de investigaciones en otras regiones del país como lo es el presente estudio que tuvo como objetivo detectar anticuerpos contra la toxina ApxIV de *A. pleuropneumoniae* y la frecuencia de infección con *A. pleuropneumoniae* en granjas porcinas tecnificadas de Arequipa, Lima, Ica y La Libertad, contribuyendo de esta forma a un mayor entendimiento de la enfermedad en nuestro país.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes

Los primeros aislamientos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* fueron realizados por Pattison *et al.* (1957) en Estados Unidos, y posteriormente en Argentina por Shope *et al.* (1964). *Haemophilus parahaemolyticus* fue uno de los sinónimos usados para esta bacteria, basado en la similitud entre *A. pleuropneumoniae* y la bacteria patógena humana *H. parahaemolyticus*. El nombre de *Haemophilus pleuropneumoniae* fue dado originalmente por Shope *et al.* (1964). Kilian *et al.* (1978), confirmó el nombre de *H. pleuropneumoniae*, al establecer que *H. parahaemolyticus* aislado de humanos era claramente distinto al los aislados de porcinos por lo que deberían ser clasificados en categorías diferentes (Taylor, 1999).

En 1983, estudios de hibridación de ADN indicaron un alta homología entre *H. pleuropneumoniae* y *Actinobacillus lignieresii*; razón por la cual *H. pleuropneumoniae* fue transferida al género *Actinobacillus* (Pohl *et al.*, 1983) denominándose hasta ahora *A. pleuropneumoniae*.

2.2. Características generales de la bacteria

A. pleuropneumoniae es una bacteria gram-negativa, integrada en el género *Actinobacillus* de la familia *Pasteurellaceae*, cocobacilar pleomórfica, de 0.5-1 x 1-2 µm con cápsula, móvil, no formadora de esporas, puede presentar formas filamentosas

cuando las condiciones de crecimiento no son las óptimas (Negrete-Abascal *et al.*, 2003; Medrano, 2003)

La mayoría de cepas de *A. pleuropneumoniae* requiere para su crecimiento medios suplementados con NAD (Nicotinamida adenina dinucleotido), como fuente de piridin nucleótido (factor V). Crece bien a 37° C y necesita una atmósfera con un 5% de CO₂ en los aislamientos iniciales (Rodríguez-Ferri *et al.*, 2002a).

El agar sangre con una estría nodriza de *Staphylococcus aureus* o *S. intermedius*, productoras de factor V; el agar chocolate y agar PPLO, son medios de cultivos convenientes para su aislamiento (Rodríguez-Ferri, 2003).

Entre sus características bioquímicas, *A. pleuropneumoniae* posee numerosas enzimas que le permiten un metabolismo muy activo. Produce ácido de la glucosa (sin gas) y también (con gas) del manitol, xilosa y ribosa y, algunas cepas, incluso de la lactosa. Además poseen una potente enzima ureasa, alfa y beta-galactosidasa, fosfatasa alcalina, reducen los nitratos a nitritos y producen SH₂ (Rodríguez-Ferri *et al.*, 2002a).

A. pleuropneumoniae se clasifica según sus requerimientos de NAD en 2 biotipos (I y II); siendo el biotipo I dependiente de NAD y el biotipo II independiente de NAD. Quince serotipos de *A. pleuropneumoniae* han sido descritos basados en las diferencias antigénicas de los lipopolisacáridos y polisacáridos capsulares (Rycroft y Garside, 2000). Nielsen *et al.* (1997) propusieron dos serotipos nuevos de *A. pleuropneumoniae*, el serotipo 13 y 14. Recientemente un nuevo serotipo, el serotipo 15, ha sido descrito en Australia por Blackall *et al.* (2002).

En cualquier caso, ambos biotipos producen pleuroneumonía porcina (PP) (Maldonado *et al.*, 2004), clínicamente indiferenciable. Sin embargo, a pesar del carácter dependiente o no de NAD, se comparten antígenos entre ambos biotipos, por lo que recientemente se ha unificado el sistema en un solo biotipo con 15 serotipos (Rodríguez-Ferri *et al.*, 2002a).

2.3. Factores de virulencia

2.3.1. Cápsula

También conocido como antígeno K, la cápsula está presente en todas las cepas de *A. pleuropneumoniae*, protegiéndola de la fagocitosis y de la lisis mediada por el complemento, tanto en presencia de anticuerpos específicos (vía clásica), como en ausencia de éstos (vía alternativa) (Dubreuil *et al.*, 2000).

Bandara *et al.* (2003), demostraron que la síntesis de polisacáridos capsulares de los serotipos 1 y 5 de *A. pleuropneumoniae* es esencial para la virulencia de la bacteria en porcinos; y que esta virulencia está influenciada por la cantidad y tipo de polisacáridos capsulares sintetizados.

Aunque los polisacáridos capsulares purificados de *A. pleuropneumoniae* no inducen la enfermedad clínica o lesiones pulmonares en porcinos, la cápsula es esencial para la virulencia de *A. pleuropneumoniae* en vivo, probablemente como un factor de virulencia que permite a la bacteria resistir al ambiente antibacteriano producido por el sistema inmunológico del hospedero (Dubreuil *et al.*, 2000).

2.3.2. Lipopolisacáridos (LPS)

Estructuralmente, la mayor parte de los lipopolisacáridos está compuesto de tres regiones distintas: el lípido A; el oligosacárido central donde el ácido keto-deoxioctulosónico (KDO), un azúcar especial de ocho carbonos, es encontrado; y el polisacárido O (cadenas O ó antígeno O), que consiste en repeticiones de unidades de oligosacáridos (Dubreuil *et al.*, 2000).

El antígeno O inmunodominante, causa reacciones cruzadas, especialmente evidentes en el caso de los serotipos 1, 9 y 11; 3, 6 y 8; y 4 y 7 (Rodríguez-Ferri *et al.*, 2002b).

Los LPS de *A. pleuropneumoniae* provocan únicamente lesiones leves en los pulmones de porcinos sin mostrar lesiones hemorrágicas ni necróticas, indicando que no son los responsables de las lesiones típicas de la PP pero que si pueden contribuir a su formación, incrementando los efectos producidos por las toxinas Apx (Haesebrouck *et al.*, 1997).

Están también implicados en la adhesión de *A. pleuropneumoniae* a las células y moco de las vías respiratorias porcinas (Jacques, 1996) y como mecanismo alternativo en la captación de hierro (Rodríguez-Ferri *et al.*, 2002a).

2.3.3. Fimbrias

Las fimbrias están presentes en una gran variedad de patógenos y su papel en la adhesión se ha definido, relacionándolas con la adherencia íntima a los alvéolos pulmonares y los bronquiolos (Sauer *et al.*, 2000).

Se han descrito aproximadamente en el 50% de las cepas, y se pierden con facilidad después de subcultivos y bajo condiciones de microaerofilia (Rodríguez-Ferri, 2003; Utrera y del Castillo, 2006). Recientemente, se han purificado fimbrias intactas y subunidades fimbriales de los serotipos 1, 2, 7, y 12 de *A. pleuropneumoniae* (Zhang *et al.*, 2000).

2.3.4. Proteínas de membrana externa (PME)

Las PME varían su perfil según la disponibilidad de diversos nutrientes y pueden diferir entre los distintos serotipos de *A. pleuropneumoniae* (Medrano, 2003). Sin embargo, proteínas comunes a todos los serotipos han sido demostradas, como: una proteína de 14Kda o lipoproteína PalA, una proteína que varía entre 32 y 42 kDa, una proteína de 24 KDa, una lipoproteína OmlA de 40-44 kDa y una proteína de 48 kDa (Haesebrouck *et al.*, 1997).

Posteriormente, se caracterizaron dos proteínas más, una proteína de 75 KDa que se une a la hemoglobina del porcino (Archambault *et al.*, 2003) y otra de 60 kDa, responsable de la adherencia al colágeno presente en el pulmón del porcino (Enríquez *et al.*, 2004).

Se ha observado que inmunizaciones con extractos crudos de PME inducen una protección inmune limitada frente al desafío con *A. pleuropneumoniae* y que sueros de animales convalecientes reconocen estas proteínas (Haesebrouck *et al.*, 1997).

2.3.5. Proteínas de unión a transferrina

En *A. pleuropneumoniae* se presentan dos proteínas de unión a transferrina denominadas TbpA y TbpB, las cuales presentan unión específica para la región C terminal de la transferrina porcina (Rodríguez-Ferri, 2003), hecho que podría constituir una de las claves de su limitación a la especie porcina (Medrano, 2003).

La importancia de TbpA y TbpB como factores de virulencia en *A. pleuropneumoniae* ha sido demostrada por la atenuación que se obtiene en cepas defectivas, pero su rol en la infección no se conoce completamente hasta ahora (Baltes, 2002).

2.3.6. Proteasas

A. pleuropneumoniae secreta proteasas capaces de degradar la gelatina porcina, las IgA, IgG y la hemoglobina (Negrete-Abascal *et al.*, 1994), entre las que se incluyen una metaloproteasa de zinc de 24 kDa específica para azocoll, gelatina y actina, común a todos los 12 serotipos, pero no a las bacterias relacionadas de la familia *Pasteurellaceae* (García *et al.*, 2000) y una metaloproteasa de zinc, de 110 KDa, con capacidad hemaglutinante y actividad proteolítica que podría intervenir en las lesiones pulmonares, al degradar proteínas del hospedador (González *et al.*, 2004).

2.3.7. Superoxidodismutasas (SOD)

En *A. pleuropneumoniae*, el gen *sodC*, codifica una SOD de cobre y zinc, que se localiza en el periplasma del microorganismo y facilita la supervivencia bacteriana en el fagosoma, dismutando el superóxido generado por las células inflamatorias (Rodríguez *et al.*, 2002a).

2.3.8. Ureasa

Actinobacillus pleuropneumoniae produce una potente ureasa cuya participación en la patogénesis aún no es clara (Rodríguez *et al.*, 2002a).

Tascón *et al.* (1997) obtuvieron mutantes ureasa negativos que mantenían intacta su virulencia, demostrando que la ureasa no es requerida para la infección con *A. pleuropneumoniae*. Sin embargo una prueba de desafío clínica mostró que, en dosis de desafío bajas, los mutantes ureasa negativos eran incapaces de establecer la infección (Bosse y MacInnes, 2000).

2.3.9. Toxinas

Son proteínas con actividad tóxica que se secretan durante el proceso infeccioso. Son fuertemente inmunógenas y poseen actividad hemolítica y citotóxica. Estas toxinas pertenecen a la familia de toxinas RTX (repeats in toxin) formadoras de poros, extensamente distribuidas entre las bacterias gram–negativas patogénicas, con toxicidad hacia los neutrófilos y macrófagos alveolares (Frey, 1995).

En *A. pleuropneumoniae*, las toxinas RTX reciben el nombre de Apx (*A. pleuropneumoniae*-RTX) y hasta la fecha se han descrito 4 en los distintos serotipos, Apx-I, Apx-II, Apx-III y Apx-IV (Frey, 1995; Schaller *et al.*, 1999).

La toxina ApxI, proteína 105 kDa, posee actividad hemolítica y citotóxica fuerte contra los macrófagos alveolares y neutrófilos, la ApxII, proteína de 103-105 kDa,

posee actividad hemolítica débil y citotóxica moderada y la ApxIII, proteína de 120 kDa, no posee actividad hemolítica, pero es fuertemente citotóxica (Frey, 1995; Dreyfus *et al.*, 2004). La toxina ApxI es expresada por los serotipos 1, 5a, 5b, 9, 10, 11 y 14; la ApxII por todos los serotipos excepto por el serotipo 10 y 14 y la toxina ApxIII por los serotipos 2, 3, 4, 6, 8 y 15 (Frey, 1995).

Recientemente, la toxina ApxIV, ha sido clonada, secuenciada y expresada, con un peso molecular de 202 kDa y actividad hemolítica débil siendo producida por todos los serotipos. Esta toxina se produce sólo en vivo y durante una infección activa. Sueros de porcinos convalecientes, que fueron infectados naturalmente o experimentalmente con todos los serotipos de *A. pleuropneumoniae*, reaccionaron fuertemente contra esta toxina (Schaller *et al.*, 1999).

El suero de porcinos sanos e infectados con *A. suis* no reaccionaron contra la toxina ApxIV, pero si con las toxinas ApxI y ApxII. Estos resultados proveen una fuerte evidencia de que ApxIV es específica de especie. Además, esta toxina es antigénicamente específica, no se han detectado reacciones cruzadas entre anticuerpos contra ApxIV y las otras toxinas Apx de *A. pleuropneumoniae* (Schaller *et al.*, 1999).

Las toxinas Apx constituyen el factor primario de virulencia de *A. pleuropneumoniae*. La cuarta toxina, ApxIV, por su alta inmunogenicidad y actividad hemolítica sugiere que puede jugar un rol pasivo en la patogénesis (Schaller *et al.*, 1999). Cepas mutantes incapaces de producir ApxI y ApxII, pero que si pudieron expresar ApxIV, no produjeron ninguna patología clínica. Si esta asunción es cierta, ApxIV sola no puede inducir patología clínica de la enfermedad (Boekema *et al.*, 2004).

Con la finalidad de demostrar la virulencia de las toxinas Apx, Tascón *et al.* (1994) obtuvieron mutantes deficientes en la producción de hemolisinas; que al ser inoculados en ratones y porcinos fueron virtualmente apatógenos.

La producción de toxinas análogas a ApxI, ApxII y ApxIII ha sido descrita en especies menos virulentas como: *A. suis*, *A. rossii*, *A. lignieresii*, *A. equuli* y *A. porcitisillarum* (Schaller *et al.*, 1999; Dreyfus *et al.*, 2004).

También se ha descrito relación entre las toxinas Apx y las toxinas RTX de otros microorganismos, como entre la alfa-hemolisina de *Escherichia coli* y la ApxI, o la LktA (leucotoxina) de *Mannheimia haemolytica* y la ApxII y en menor grado la ApxI (Medrano, 2003).

2.4.Epidemiología

2.4.1. Agente

A. pleuropneumoniae tiene un tiempo de supervivencia muy corto en el ambiente (Taylor, 1999), pudiendo llegar a sobrevivir 5 días cuando está protegido con descargas nasales, semanas en lesiones pulmonares y al menos de 4 a 6 meses en las tonsilas (Palomo, 1996).

Es altamente sensible a los desinfectantes comunmente usados (Palomo, 1996) y es especialmente susceptible al calor, sobreviviendo pocas horas en desecación (Rodríguez *et al.*, 2002a).

Ha sido reportado prácticamente de todos los países europeos (Dubreuil *et al.*, 2000) y de diferentes partes de los Estados Unidos y Canadá, Japón, Corea, Taiwán, Filipinas, Australia (Schultz *et al.*, 1982; Taylor, 1999; Chiers *et al.*, 2002; Kucerova *et al.*, 2005; Gunn-McQuillan, 2005; Nussbaumer *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2006). Datos de pocos países de América Latina han sido publicados, entre ellos, los de Argentina, Chile, Brasil, Venezuela, Perú y México (Utrera *et al.*, 1989; Calle *et al.*, 1996; Moguel, 1997; Moreno *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 2000; Bersano *et al.*, 2003; Álvarez *et al.*, 2004; Zielinski, 2006).

Existen diferencias significativas en la virulencia entre los 15 serotipos. Los serotipos 1 y 5 y en cierta medida también los serotipos 9 y 11 están implicados en brotes severos de la enfermedad (Frey, 1995).

Más de un serotipo de *A. pleuropneumoniae* pueden estar presentes en una misma granja, con diversos grados de patogenicidad, de acuerdo al perfil toxigénico que expresen (Chiers *et al.*, 2002).

2.4.2. Hospederos

A. pleuropneumoniae es un estricto patógeno del sistema respiratorio porcino y especie específico para la especie porcina. Sin embargo, ha sido reportado de casos individuales de artritis en corderos y terneros (Olander, 1963; Gutiérrez *et al.*, 1997), observándose además que cobayos, ratas y ratones, representan buenos modelos de infección (Somchit *et al.*, 2004).

A. pleuropneumoniae se aísla de la cavidad nasal, tonsilas y lesiones pulmonares de los porcinos, siendo los animales portadores asintomáticos o con infección crónica la principal fuente de infección (Bossé *et al.*, 2002).

2.4.3. Modo de transmisión

La principal forma de transmisión es por contacto directo entre animal infectado y animal susceptible (Taylor, 1999). La transmisión por vía aerógena es un evento raro. Sin embargo, Jobert *et al.* (2000) y Torremorell *et al.* (1997), demostraron la transmisión aérea a un 1 metro, y a 2 metros y medio de distancia, respectivamente.

Por el contrario, Kristensen *et al.* (2004) encontraron que para que ocurra una transmisión consistente, la cantidad de aire necesaria que debe pasar de un local infectado a uno susceptible debe ser del 70%. Sin embargo, simulando condiciones naturales la cantidad de aire que pasa de un local a otro no supera el 2 %.

La transmisión a través de roedores pequeños o pájaros es aún dudosa (Taylor, 1999), ya que el microorganismo posee escasa supervivencia en el medio ambiente, aunque se encuentre protegido por materia orgánica. No obstante, la transmisión a través de vehículos contaminados ha sido demostrada (Fussing *et al.*, 1998).

La introducción de marranas de reemplazo subclínicas portadoras de *A. pleuropneumoniae* es también uno de los puntos claves de la transmisión de la infección (Wongnarkpet *et al.*, 1999; Zielinski *et al.*, 2006).

Vigre *et al.* (2002), detectaron lechones lactantes de 11 días positivos a la infección con *A. pleuropneumoniae*, evidenciando que a pesar que ésta no es la edad más frecuente de infección, estos animales pueden ser considerados una fuente de infección.

2.4.4. Pleuroneumonía porcina (PP)

Actualmente, *A. pleuropneumoniae* está ampliamente extendido por todo el mundo (Dubreuil *et al.*, 2000), particularmente relacionado con las granjas porcinas de explotación intensiva. Presenta una incidencia creciente debido a la intensificación y la masificación en las explotaciones porcinas, siendo importantes una correcta practica de manejo de la granja (Maes *et al.*, 2002), siendo claves los intercambios comerciales para su extensión (Medrano, 2003).

La pleuroneumonía puede ocurrir en animales de todas las edades (Bossé *et al.*, 2002). La edad más receptiva es entre las 6 a 15 semanas, especialmente, entre las 6 a 8 semanas al disminuir el título de anticuerpos calostrales, aunque otras son posibles (Rodríguez *et al.*, 2002b).

El período de incubación puede ser variable. Ha sido demostrado que la expresión de la enfermedad es dosis dependiente (Marsteller y Fenwick , 1999).

Desde el punto de vista epidemiológico, Marsteller y Fenwick (1999) clasifica a las granjas porcinas en cuatro categorías respecto a la presencia de signos clínicos y al estado serológico. Indicando que aproximadamente el 80% de las granjas porcinas caen en la categoría 1, granjas clínicamente negativas y serológicamente positivas.

2.4.5. Factores predisponentes para el desarrollo de la pleuroneumonía porcina

Muchas granjas están infectadas subclínicamente con *A. pleuropneumoniae*, debido al equilibrio inmunológico y un manejo adecuado (Gottschalk, 2005). Generalmente, la incidencia más alta de brotes de la enfermedad es observada en porcinos de crecimiento y acabado, debido a determinados factores que predisponen la manifestación de la enfermedad (Taylor, 1999).

Entre los factores predisponentes de la enfermedad tenemos: el hacinamiento, una inadecuada ventilación, el movimiento y mezcla de los animales, el transporte de los animales y los cambios climáticos abruptos. De igual forma, se considera la presencia de otras enfermedades ocasionadas por el virus de PRSS, virus de Aujeszky, virus de influenza porcina, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Haemophilus parasuis* (Taylor, 1999).

Diosdado *et al.* (1999), observaron que la infección conjunta con el virus de Aujeszky y *M. hyopneumoniae* aumentó la susceptibilidad a la infección con *A. pleuropneumoniae*. Sin embargo, no se encontró asociación entre la presencia de anticuerpos contra el virus de PRSS y *A. pleuropneumoniae* (Disodado *et al.*, 2004).

2.4.6. Impacto económico

Actinobacillus pleuropneumoniae, forma parte del complejo respiratorio porcino, asociado a múltiples agentes patógenos, incluyendo el virus de PRRS, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, el virus de la Influenza porcina (SIV), *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, virus de la enfermedad de Aujeszky (Thacker y Thacker, 2000).

Las pérdidas económicas debidas a brotes agudos de la pleuronuemonía porcina son atribuibles principalmente a la elevada mortalidad, que puede alcanzar el 100% de los lechones y el 25% de los adultos de engorde (Medrano, 2003), y a los costos de la

medicación. En los casos crónicos, se deben principalmente a la disminución en la tasa de crecimiento, disminución en la ganancia diaria de peso y al incremento del índice de conversión alimenticia (Taylor, 1999). La tasa de morbilidad varía entre el 8,5% y el 40% (Gutiérrez *et al.*, 1997).

2.5. Patogenia

A. pleuropneumoniae penetra por las vías respiratorias superiores, concentraciones de 10^4 de la bacteria por mililitro vía aerosol (10^2 en serotipos más patógenos), son suficientes para causar la enfermedad (Palomo, 1996).

La adherencia de *A. pleuropneumoniae* a las células epiteliales tonsilares constituye probablemente el primer paso en el establecimiento bacteriano (Chiers *et al.*, 1999). La adherencia a la mucosa respiratoria y a los anillos traqueales es posible por acción combinada de las fimbrias, cápsula y LPS (Boseé *et al.*, 2002).

Siguiendo a la adhesión a las células del hospedero, el establecimiento de la infección depende de la habilidad de *A. pleuropneumoniae* para adquirir todos los nutrientes esenciales para su crecimiento, produciendo para esto factores como las proteínas TbpA y TbpB (Baltes, 2002), LPS, las PME (Archambault *et al.*, 2003), la ureasa (Bossé y MacInnes, 2000) y proteasas (González *et al.*, 2004).

Cuando *A. pleuropneumoniae* llega al pulmón, es fagocitado por los macrófagos, pudiendo sobrevivir por más de 90 minutos en su interior (Boseé *et al.*, 2002), tiempo durante el cual liberan las toxinas, pudiéndose producir después de 30 a 60 minutos la aniquilación del macrófago (Palomo, 1996). También son tóxicas para los neutrófilos y células endoteliales (Haesebrouck *et al.*, 1997). Factores como, la cápsula y el LPS; la SOD de cobre-zinc; las proteínas de estrés; y el amoníaco (Boseé *et al.*, 2002) pueden contribuir a su supervivencia dentro del macrófagos alveolares.

La actividad hemolítica y citotóxica de las toxinas Apx es responsable directamente del daño tisular, y de las lesiones necróticas-hemorrágicas observadas en el pulmón (Boseé *et al.*, 2002).

El LPS y las Apx están involucrados en la liberación de metabolitos de oxígeno tóxicos, enzimas proteolíticas y citocinas, especialmente las IL-1, IL-6 e IL-8, las cuales son importantes en la respuesta local en alvéolos, así como, en la activación del sistema de coagulación de la sangre (por activación del factor XII), fibrinólisis y sistema de quininas, lo que da lugar a la formación de microtrombos, isquemia localizada y necrosis subsecuente, característica de la PP aguda (Boseé *et al.*, 2002).

Las lesiones necrótico-hemorrágicas a nivel pulmonar pueden ser evidentes a las 3 horas postinfección en casos sobreagudos y en 6 horas en los casos agudos. Se produce una congestión capilar de la pared alveolar con edema marcándose el septo intersticial. En casos de bacteremia el cuadro clínico se hace mucho más severo y puede presentarse muerte sobreaguda.

A medida que pasan los días se produce muerte de macrófagos y neutrófilos que se acumulan en la lesión y a nivel de los bronquios, provocando una trombosis arterial con necrosis tisular. Cuatro días posteriores a la infección las lesiones pulmonares están bien demarcadas y es posible aislar a *A. pleuropneumoniae*. Con la evolución, la lesión comienza un proceso de fibrosis que conduce a la cicatrización (Palomo, 1996; Rodríguez *et al.*, 2002a; Utrera y del Castillo, 2006).

2.6. Inmunidad

Se conoce extensamente, que el papel dominante en la protección del sistema inmune en la pleuroneumonía porcina es desempeñado por la IgG circulante en la sangre (Hensel *et al.*, 1994).

Después de la supervivencia a la infección natural, los porcinos desarrollan inmunidad protectora contra un posterior desafío (Taylor, 1999). Cruijsen *et al.* (1995) encontraron que porcinos convalecientes, infectados experimentalmente con *A. pleuropneumoniae*, podían desarrollar una inmunidad protectora hacia los serotipos homólogos y una inmunidad variable hacia los serotipos heterólogos.

La infección genera la producción de anticuerpos dirigidos contra una gama amplia de estructuras y productos bacterianos, incluyendo, la cápsula, el LPS, las PME, proteínas de unión a transferrina, SOD y las toxinas Apx (Taylor, 1999).

Se ha determinado que la presencia de anticuerpos contra las Apx es un requisito imprescindible para una respuesta inmune completa, en cambio, la de anticuerpos contra el LPS o polisacáridos capsulares no lo es (Medrano, 2003).

Anticuerpos circulantes pueden ser detectados con la prueba de fijación de complemento a partir de los 10 días post-infección con un nivel máximo después de 3 a 4 semanas, pudiendo persistir por muchos meses (Haesebrouck *et al.*, 1997).

Los macrófagos alveolares y neutrófilos son importantes en el sistema de defensa del pulmón contra la infección con *A. pleuropneumoniae*. Haesebrouck *et al.* (1997), indicaron que a pesar de la presencia de anticuerpos contra las toxinas Apx, la muerte de los macrófagos ocurre, por el contrario, estos anticuerpos protegen a los neutrófilos y permiten la eliminación de la bacteria.

2.6.1. Inmunidad humoral

La respuesta humoral inmune, es crucial en la defensa contra la infección con *A. pleuropneumoniae*. La hipótesis de que la IgG es la inmunoglobulina de mayor importancia es apoyada por experimentos de transferencia de suero de porcinos convalecientes, causando títulos de IgG similares a aquellos en porcinos inmunizados, confiriendo protección a un posterior desafío (Bossé *et al.*, 1992).

El papel de la Ig M también ha sido descrito en lechones que fueron expuestos a altas dosis de *A. pleuropneumoniae* a las 3 y 8 semanas de edad. Todos los lechones infectados tuvieron altos niveles de anticuerpos IgM contra el LPS de *A. pleuropneumoniae*, aún en el caso donde altas concentraciones de anticuerpos IgG estuvieron presentes en el suero (Krejci *et al.*, 2005).

Debido a que las mucosas son la primera vía de contacto con el microorganismo, el papel de las IgA en la etapa inicial de la infección es importante. La presencia de estas inmunoglobulinas en los fluidos nasales y broncoalveolares resulta básica para la opsonización y neutralización de la bacteria, antes de que ésta pueda alcanzar las vías respiratorias inferiores (Loftager y Eriksen, 1993).

Vigre *et al.* 2002, observaron que la seroconversión de los animales infectados a nivel tonsilar se dió entre las 2 y 4 semanas post-infección, lo que coincidió con lo encontrado por Medrano (2003).

Chiers *et al.* (2002) determinaron que los títulos de anticuerpos calostrales decrecían a las 8 semanas de vida, estableciéndose seroconversión a partir de las 16 semanas, lo que denotaba que la infección se producía a partir de la 12 semana. Pero se encontraron animales infectados a nivel tonsilar y cavidad nasal, los cuales eran negativos serológicamente sugiriendo que tal infección no provocaba seroconversión. No obstante, debe considerarse que el método serológico utilizado, basado en la detección de las toxinas ApxI, ApxII y ApxIII, tal vez no era lo suficientemente sensible para detectarlos.

Los anticuerpos contra la toxina ApxIV no se producen en animales que son portadores de la bacteria a nivel nasal, sin colonización e infección tonsilar o pulmonar (Schaller, 1999).

2.6.2. Inmunidad celular

La inmunidad celular no es esencial para la protección contra *A. pleuropneumoniae* (Haesebrouck *et al.*, 1997) Sin embargo, mediante infecciones experimentales con *A. pleuropneumoniae* vía aerosol, se ha observado un incremento del número de linfocitos T (CD4 y CD8) en el tejido linfoide asociado a los bronquios y una concentración elevada de neutrófilos en los lavados pulmonares, que normalmente están ausentes (Delventhal *et al.*, 1992).

2.6.3. Inmunidad maternal

Las hembras inmunes confieren la inmunidad pasiva a su descendencia, a partir del calostro, donde los niveles de IgG e IgM dependen de su transferencia desde la sangre, aunque una pequeña cantidad de las IgA, se sintetizan en la mama (Rodríguez *et al.*, 2002b).

La duración de la inmunidad calostrual oscila entre 2 a 12 semanas, dependiendo principalmente del nivel de anticuerpos obtenidos a partir de la madre (Haesebrouck *et al.*, 1997; Vigre *et al.*, 2003; López y Mourits, 2006), sin embargo se ha observado que la protección no supera las 3 semanas (Haesebrouck *et al.*, 1997).

La inmunidad calostrual posee un efecto protector contra la infección por *A. pleuropneumoniae* (Rodríguez *et al.*, 2002b). Nechvatalova *et al.*, (2005), demostraron que lechones que obtuvieron anticuerpos calostrales y que fueron expuestos a una baja dosis de infección con *A. pleuropneumoniae* resistieron un posterior desafío, sin embargo, no se previno el desarrollo de lesiones pulmonares.

La presencia de inmunidad calostrual es un factor importante, que interfiere en la inmunidad activa de los lechones (Krejci *et al.*, 2005), demostrándose que una típica respuesta inmune primaria solo es evidente en lechones que no poseen anticuerpos calostrales al momento de ser desafiados.

Chiers *et al.* (2002), encontraron que la colonización de las vías respiratorias superiores altas puede ocurrir en presencia de anticuerpos maternos.

2.7. Signos clínicos y lesiones

El curso clínico de la enfermedad puede ser desde hiperagudo hasta crónico dependiendo del serotipo infeccioso, el nivel inmune del porcino, y del grado de exposición al agente infeccioso (Bossé *et al.*, 2002).

Durante la enfermedad hiperaguda y aguda los porcinos exhiben algunos de los signos clínicos, que incluyen: fiebre, incremento de la frecuencia cardíaca, tos, epistaxis, disnea, anorexia, ataxia, vómitos, diarrea, y una severa dificultad respiratoria con cianosis (Bossé *et al.*, 2002). La presencia de abundante secreción espumosa y rojiza en ollares y boca puede presentarse previo a la muerte. La muerte generalmente sobreviene en 24 a 36 horas, sin embargo, el curso de la enfermedad puede llegar a ser tan corto, 3 horas, no llegándose a observarse signos clínicos. (Taylor, 1999).

Las lesiones características consisten en una neumonía necrótica fibrino-hemorrágica con pleuritis serofibrinosa y adherencias costales. La neumonía es principalmente bilateral, involucrando los lóbulos cardíacos, apicales y parte de los lóbulos diafragmáticos donde las lesiones neumónicas son a menudo focales y bien demarcadas, ocupando hasta el 50% del parénquima pulmonar (Taylor, 1999; Palomo, 1996).

Microscópicamente, las lesiones características consisten en áreas de necrosis por coagulación asociadas con vasculitis y trombosis. En las fases tempranas de la enfermedad, la marcada infiltración de polimorfonucleares, fibrina, eritrocitos y el edema son aparentes. En las fases más tardías, la infiltración de macrófagos es más notoria y las áreas necróticas son rodeadas con franjas densas de leucocitos degenerados (Bossé *et al.*, 2002).

Los animales que sobreviven a la infección pueden llegar a tener una completa resolución de las lesiones, pero frecuentemente se desarrolla un secuestro de las áreas necróticas y/o abscesos rodeados por una proliferación de tejido de granulación conteniendo un elevado número de microorganismos (Bossé *et al.*, 2002). Lesiones en las células epiteliales, edema e infiltración de PMN en las tonsilas han sido descritas (Chiers *et al.*, 1999).

A pesar que las lesiones provocadas por la infección con *A. pleuropneumoniae* generalmente se limitan al sistema respiratorio porcino se ha podido observar su participación en casos de otitis media, peritonitis fibrinosa, meningoencefalitis purulenta, endocarditis ulcerosa, artritis y osteomielitis (Duff *et al.*, 1996; Jensen *et al.*, 1999; Taylor, 1999; Madsen *et al.*, 2001).

2.8. Diagnóstico

Los métodos de diagnóstico de las infecciones por *A. pleuropneumoniae* son diversos y han evolucionado mucho en los últimos años. El diagnóstico de la PP puede realizarse a través de: a) el diagnóstico clínico-anatomopatológico, por observación de síntomas y lesiones típicas, b) el diagnóstico bacteriológico, c) el diagnóstico serológico y d) mediante pruebas moleculares que han sido añadidas recientemente (Stark, 2000).

El diagnóstico clínico-anatomopatológico es relativamente fácil y útil en la forma aguda y crónica de la enfermedad. Por el contrario, el diagnóstico se torna difícil y confuso cuando la enfermedad se presenta en la forma subclínica. En estas condiciones la forma más común de diagnóstico es la serología (Rosales, 2005).

Para el diagnóstico bacteriológico se utilizan muestras de exudados bronquiales o nasales, tonsilas y de lesiones pulmonares (Taylor, 1999). El aislamiento a partir de animales portadores crónicos, donde el número de bacterias presentes en las vías respiratorias es bajo y está mezclado con la flora natural, es difícil e incierto (Rodríguez *et al.*, 2002a), donde la técnica de siembra y cultivo, así como, la selección de las muestras son factores importantes (Williams *et al.*, 2000; Sidibe *et al.*, 1993).

En el Perú, *A. pleuropneumoniae* fue aislado por primera vez en el año 1988 por Calle y Camacho en el departamento de Trujillo. Posteriormente, Castillo (1996), realizó el aislamiento de muestras de hisopados de pulmón tomadas en un camal de Lima.

Actualmente el método serológico (detección de anticuerpos) es usado por la mayoría de los laboratorios. Este método es uno de los más adecuados, ya que se puede realizar en los animales vivos con y sin signos clínicos, es más rápida y permite muestrear un gran número de animales. Las pruebas serológicas que buscan la identificación del serotipo son especialmente útiles para completar el diagnóstico bacteriológico, para determinar el tratamiento o para la preparación de autovacunas homólogas. Las pruebas independientes de serotipo pretenden ser métodos más

generales de control, permite asegurar la presencia de *A. pleuropneumoniae*, nos permite hacer perfiles de la enfermedad, identificando el punto de infección en la granja y estimar la extensión de la infección en la explotación (Medrano, 2003).

La serotipificación, es el método comúnmente utilizado en la tipificación de *A. pleuropneumoniae*, basado en la determinación del tipo de antígenos capsulares presentes en cada aislamiento, que permite su agrupación en serotipos. Para este fin varias técnicas han sido usadas, siendo las más comunes: la aglutinación rápida en placa, la coaglutinación, la hemaglutinación indirecta, la prueba de fijación del complemento, inmunofluorescencia indirecta, la inmunodifusión en gel, el ensayo de inmunoabsorción unido a enzimas, la precipitación en anillo (Lo, 1997) y el radioinmunoensayo (Inzana *et al.*, 1990).

2.8.1. Pruebas de laboratorio para la detección de anticuerpos

2.8.1.1. Fijación de complemento (FC)

La FC fue adaptada al diagnóstico de la pleuroneumonía porcina por Nicolet en 1971 (Lo, 1997). Lombin *et al.* (1992), describieron la técnica, usando sobrenadantes de una suspensión bacteriana preparados por sonicación como antígeno; complemento de cobayo, suero de bovino, glóbulos rojos de cordero, y el suero a prueba. Ha sido sustituida progresivamente por el ELISA, ya que es una prueba laboriosa y poco sensible y presenta reacciones cruzadas con otras especies de *Actinobacillus* y *Haemophilus* (Inzana y Mathison, 1987). A pesar de estos inconvenientes es utilizada aún como prueba de referencia en países de Europa y Estados Unidos (Montaraz *et al.*, 1996).

2.8.1.2. Inhibición de la hemolisina (IH)

La IH, detecta anticuerpos contra la toxina ApxI. Esta característica le da la desventaja de detectar únicamente infecciones por los serotipos 1, 5, 9, 10 y 11. En adición, no puede diferenciar entre estos serotipos y, lo más importante, no puede

diferenciar las infecciones producidas por otras especies bacterianas que producen toxinas similares (Montaraz *et al.*, 1996; Gottschalk, 2004).

2.8.1.3. Aglutinación en placa

En México, esta prueba ha sido utilizada ampliamente. Detecta anticuerpos capsulares de alta afinidad contra los serotipos 1, 3, 5 y 7. Las ventajas que ofrece es ser sencilla, fácil de realizar y económica. Sin embargo, tiene como desventaja su poca sensibilidad y especificidad, ser serotipo específica, la presencia de reacciones cruzadas con otros serotipos y otras especies de *Actinobacillus* y *Haemophilus*, y el no poder discriminar anticuerpos vacunales (Inzana y Mathison, 1987; Rosales, 2005).

Ciprian *et al.* (1999), reportaron el uso de esta técnica para la identificación de anticuerpos IgG dirigidos contra la cápsula de los 12 serotipos de *A. pleuropneumoniae*.

En el Perú, Calle *et al.* (1996) y Castillo, (1996), usaron la prueba de aglutinación en placa para detectar anticuerpos contra los serotipos 1, 3, 5 y 7 de *A. pleuropneumoniae* en granjas porcina tecnificadas y de un camal de Lima, respectivamente.

2.8.1.4. Ensayo de inmunoabsorción unido a enzimas (ELISA) indirecto

Nicolet *et al.* (1981) utilizaron esta técnica por primera vez en el diagnóstico y, desde entonces, ha sido el procedimiento más extendido desplazando a la FC.

De todas las pruebas serológicas el ELISA es la que posee mayor sensibilidad y especificidad, además de poder utilizarse de modo automático. El uso de ELISA indirecta para los serotipos 1, 2, 5, y 7 han sido reportados por diversos investigadores (Bosse *et al.*, 1990, 1993; Inzana y Fenwick, 2001; Klausen *et al.*, 2002).

Las largas cadenas de LPS (LC-LPS) han sido usadas como antígenos convenientes para el serodiagnóstico de los serotipos 1, 2, 4, 5, 6, 7 y 12 (Gottschalck *et al.*, 1994a, 1994b, 1997; Grondahl *et al.*, 2003).

El ELISA de inhibición o bloqueo, ha sido usado exitosamente para la mayoría de los serotipos (Nielsen *et al.*, 1991; Nielsen *et al.*, 1993; Stenbaek y Schirmer, 1994; Klausen *et al.*, 2001; Andresen *et al.*, 2002).

El desarrollo de un ELISA indirecto utilizando como antígenos las proteínas ApxI y Tbp2, fue realizado por Medrano (2003).

Pruebas de ELISA utilizando las toxinas Apx han sido desarrolladas por varios investigadores (Leiner *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 2000; Dreyfus *et al.*, 2004).

Las pruebas de ELISA basadas en la toxinas Apx y en la proteína de membrana Tbp2 no son capaces de diferenciar las infecciones producidas por otras especies bacterianas que producen toxinas y proteínas similares, como *E. coli* hemolítica, *A. suis* y *H. parasuis* (Medrano, 2003; Gottschalk, 2004).

Dreyfus *et al.* (2004) desarrollaron un ELISA indirecto basado en el uso de la toxina recombinante ApxIV. El estudio de prevalidación de la prueba demostró una especificidad del 100 % y una sensibilidad del 93.8 %, pudiendo detectar animales con infecciones agudas y crónica así como animales, que han sufrido infecciones subclínicas. Además detecta anticuerpos generados durante una infección activa a nivel tonsilar.

Esta prueba de ELISA fue capaz de detectar anticuerpos desde las 3 semanas postinfección en promedio, sin embargo pudo comenzar a detectar anticuerpos en porcinos experimentalmente infectados con los serotipos 1, 6, 7, 10 y 15 a partir de los 7 a 28 días post-infección. Porcinos vacunados con una vacuna subunitaria conteniendo las toxinas Apx I, Apx II y Apx III resultaron negativos a esta técnica de ELISA (Dreyfus *et al.*, 2004). Nussbaumer *et al.* (2006), realizaron estudios de prevalencia en Suiza utilizando ELISA ApxIV detectando cerca del 80% de granjas matrices y cerca

del 40% de granjas comerciales positivas al agente infeccioso, así también, García (2007) utilizó esta prueba para detectar la infección en madres provenientes de una granja porcina.

2.8.2. Pruebas de laboratorio para la detección de antígenos

2.8.2.1. Coaglutinación

Es una técnica simple y rápida para la identificación de *A. pleuropneumoniae*. Emplea antisueros de conejo específicos de serotipo, mezclados con una proteína A producida por cepas de *S. aureus* (Mittal *et al.*, 1983). Permite la detección de animales infectados simultáneamente con varios serotipos y la posibilidad de trabajar con muestras en mal estado. Es bastante específica y más sensible que el aislamiento bacteriano, pero sólo detecta un pequeño porcentaje de animales infectados de forma crónica (Mittal *et al.*, 1993).

2.8.2.2. Inmunohistoquímica

Técnica basada en la utilización de antisueros específicos de serotipo, marcados con peroxidasa o con biotina. Es rápida, fácil de ejecutar y permite trabajar sobre muestras fijadas con antigüedad (Gutiérrez *et al.*, 1993). Hernández *et al.* (2002), reportaron la identificación del serotipo 1 de *A. pleuropneumoniae* de pulmones de porcinos con y sin lesiones neumónicas, usando esta técnica.

2.8.3. Pruebas de laboratorio para la detección de ADN

2.8.3.1. Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

La PCR se utilizó por primera vez por Sirois *et al.* en 1991 utilizando primers inespecíficos. Lo (1997), describieron la primera PCR capaz de detectar el serotipo 5 a través de la identificación de una región codificante para la cápsula, aunque no fueron

capaces de aplicar el procedimiento al resto de serotipos. Posteriormente, Hüseyin *et al.* (2004), aplicaron esta técnica al serotipo 2.

El PCR o PCR-REA (análisis de restricción de enzimas) basado en el gen *omlA*, ha sido empleado por Gram *et al.* (2000) y Cho y Chae (2003a).

Posteriormente, Schaller *et al.* (2001) propusieron el uso del gen *apxIV* y Chiers *et al.* (2001) el uso del gen *dsbE-like*, con buenos resultados en la detección del agente. Otros estudios propusieron el uso de la PCR anidado en tejidos fijados en formalina (Cho y Chae, 2003b) y la aplicación de la PCR-REA para la detección del gen *apxIV* (Jaglic *et al.*, 2004).

Otros investigadores han desarrollado métodos basados en variantes de la PCR, como: PCR múltiplex para los serotipos 2,5 y 6 (Jessing *et al.*, 2003), PCR-RFLP (Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción) en base a la secuencia del gen *aroA* (Rodríguez *et al.*, 2002a) y RAPD (Amplificación aleatoria de polimorfismos de ADN) (Chatellier *et al.*, 1999; Vaz, 2002).

2.8.3.2. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)

Las técnicas moleculares para el análisis de ADN cromosomal como el PFGE han demostrado ser un método eficiente para resolver divergencias entre las diferentes cepas y ha sido bastante utilizado en el estudio epidemiológico. Fussing (1998), utilizó la PGFE para demostrar la relaciones genómicas entre 112 cepas del serotipo 2 de *A. pleuropneumoniae* aisladas de Estados Unidos y Europa.

2.8.3.3. Ribotipificación

Esta técnica ha sido usada para la detección y diferenciación entre serotipos de *A. pleuropneumoniae* (Fussing *et al.*, 1998). Jaglic *et al.* (2004), fueron capaces de distinguir con esta técnica, cepas pertenecientes a los 12 serotipos de *A. pleuropneumoniae*, pero no las pertenecientes a los serotipos 1, 9, y 11.

2.8.3.4. Diagnóstico diferencial

Una de las principales dificultades del diagnóstico radica en diferenciar la pleuroneumonía porcina de otras patologías respiratorias, siendo una de las situaciones más frecuentes la implicancia de *A. pleuropneumoniae* en cuadros polimicrobianos en los que la importancia relativa de cada patógeno y, sobre todo, el agente etiológico original, resultan de difícil determinación (Thacker y Thacker, 2000). Muchas enfermedades sistémicas y pulmonares pueden potencialmente causar signos clínicos y lesiones similares a las producidas por *A. pleuropneumoniae*. Los patógenos más comunes que deben ser considerados para el diagnóstico diferencial son: el virus del cólera porcino, el virus de la influenza, el virus de PRRS, *Haemophilus parasuis*, *Salmonella choleraesuis*, *P. multocida*, *M. hyopneumoniae*.

2.9. Tratamiento

Diversos agentes antimicrobianos han sido utilizados para la prevención y tratamiento de las neumonías bacterianas (Taylor, 1999) Sin embargo, ninguno de ellos tiene acción específica contra *A. pleuropneumoniae*.

Se han realizado seguimientos de la sensibilidad a antibióticos de las cepas de *A. pleuropneumoniae* encontrando variaciones en cuanto a su localización geográfica. Se ha determinado la sensibilidad de la bacteria a los antibióticos con cepas provenientes de España, entre los años 1997-2004 (Gutiérrez *et al.*, 2006). Las bacterias eran muy susceptibles a cefalotina, cloranfenicol y doxiciclina, altamente resistente a las tetraciclinas y moderadamente resistente a las penicilinas, trimetoprim, sulfisoxazole, y gentamicina. Una resistencia a los antibióticos, como: tetraciclina, doxiciclina, norfloxacin, estreptomycin, tiamulina, eritromicina y ácido nalidixico fueron vistas en un estudio realizado en la Republica Checa (Nedbalcova *et al.*, 2005). En Japón, los antibióticos más activos fueron el ceftiofur, amikacina y cefalotina; existiendo una resistencia a la mayoría de antibióticos de uso generalizado (Chang *et al.*, 2002).

En Sudamérica, un estudio realizado en Venezuela (Pineda *et al.*, 1996) mostró una alta resistencia hacia la eritromicina, estreptomicina, triple sulfa, penicilina y lincomicina, observándose la emergencia de cepas de *A. pleuropneumoniae* probablemente resistentes debido al uso indiscriminado de estos agentes como preventivos y terapéuticos en la crianza porcina. Otro estudio comparativo entre la concentración inhibitoria mínima de varios antibióticos frente a cepas de *A. pleuropneumoniae* aisladas en Argentina, demostró que el antibiótico más eficaz era la tilmicosina, mientras que la eritromicina y tilosina demostraron una sensibilidad intermedia (Moredo *et al.*, 2001).

Por la emergencia de resistencia mediada por plásmidos a diferentes antibióticos, la variedad de antimicrobianos usados para el tratamiento de la PP ha ido disminuyendo. Entre los antibióticos de elección están, la tilmicosina (Paradis *et al.*, 2004), la tulatromicina, el florfenicol, el ceftiofur sódico, la tiamulina entre otros (Taylor, 1999; Utrera y del Castillo, 2006).

El uso de tilmicosina ha sido reportado de utilidad en la terapia de animales en la fase de crecimiento, reduciendo las lesiones pulmonares (Clark *et al.*, 1999). Las terapias con amoxicilina y danofloxacin, usadas por separado, demostraron ser tan efectivas como la dosificación fraccionada en varias dosis (Lauritzen *et al.*, 2003; Utrera y del Castillo, 2006).

Debido al curso agudo de la enfermedad, el tratamiento por vía parenteral es la mejor vía de tratamiento. El tratamiento en el agua de bebida y pienso puede utilizarse en animales que aún tienen capacidad de beber y comer. Una combinación de la medicación vía oral y parenteral en un brote reciente normalmente ofrece los mejores resultados (Rodríguez *et al.*, 2002a).

A pesar de esto, los resultados del tratamiento son decepcionantes debido a la gravedad de la forma aguda y a la persistencia de la infección en animales reestablecidos. Aunque los antibióticos pueden reducir la mortalidad, mejorar la ganancia de peso diario y reducir las lesiones, los animales siguen alojando la bacteria y son una fuente de infección para otros animales.

2.10. Prevención y control

Existen dos opciones para el control y prevención de la PP:

- Control económico, mediante un manejo adecuado en combinación con el posible uso de la vacunación.
- Erradicación de la infección en la granja.

La elección de una de estas dos alternativas, está en función del tipo de explotación, libre o portadora del microorganismo, y requiere el análisis minucioso de las ventajas y desventajas de cada una (Radostits *et al.*, 2001).

En una explotación libre el principal objetivo es continuar manteniendo la explotación en esa situación. La atención se centra siempre en el control de los animales de reposición, sobre los que será necesario aplicar una cuarentena y un control serológico exhaustivo para detectar animales con infecciones subclínicas, combinándolos, si es posible, con ensayos de detección de antígeno en vías respiratorias superiores. En una explotación sin experiencia inmunológica previa, la entrada de una cepa virulenta puede ser causa de situaciones sanitarias muy perjudiciales, la vacunación en estos casos es recomendada. (Rodríguez *et al.*, 2002a).

Cuando una explotación está infectada con serotipos que no provocan consecuencias graves (en término de mortalidad o lesiones), puede ser preferible convivir con el microorganismo que poner en práctica costosísimos programas de saneamiento. Establecida la infección en la granja, es difícil de erradicar el agente infeccioso, aunque no haya presencia de signos clínicos. (Rodríguez *et al.*, 2002a).

La práctica estricta del sistema todo dentro-todo fuera por lotes, en combinación con: tratamientos estratégicos; control de factores ambientales; control de la densidad de animales y uso de vacunas, constituyen un método muy efectivo para controlar la expresión clínica de la enfermedad. El seguimiento serológico de las marranas y lechones, el destete precoz segregado (SEW) y la creación de grupos de aislamiento por

edades, son medidas que minimizan la transmisión vertical y horizontal dentro de las explotaciones. Sin embargo, en algunos casos usando el SEW por edades con una edad al destete temprana, la transmisión puede aún ocurrir (Rodríguez *et al.*, 2002a).

La identificación de los animales portadores mediante pruebas serológicas que detectan anticuerpos contra *A. pleuropneumoniae*, la serotipificación y en algunos casos el uso del PCR para la detección directa del agente juegan un papel clave en el control de la PP.

La vacunación de las madres ha demostrado poseer un efecto positivo en la estabilización de la inmunidad y en reducir la incidencia del problema en porcinos destetados (Sjölund *et al.*, 2004).

En explotaciones que practican los métodos de destete por segregación y el sistema todo dentro todo fuera, es posible que los porcinos en cría estén en la categoría 1 (animales serológicamente positivos y clínicamente negativos) y los de crecimiento en la categoría 2 (serológicamente y clínicamente negativos). Si la gestión de manejo de los porcinos en crecimiento es mantenida y la bioseguridad es adecuada, porcinos clínicamente negativos pueden ser producidos de piaras de marranas infectadas endémicamente (Marsteller, 1999).

Las medicaciones pulsátiles o estratégicas (medicar de forma preventiva antes de que aparezca el problema) son de elección para el control de la infección dado que permiten reducir el nivel de infección evitando enfermedad clínica, pero existe cierto grado de infección que permite el desarrollo de inmunidad activa frente al patógeno. Desde un punto de vista práctico, se suele preferir la medicación en el alimento, aunque el uso de medicamentos en agua o como inyectable pueden ser necesarios en brotes clínicos (Thacker y Thacker, 2000). La combinación de florfenicol y tilosina en animales desde los 50 kilos de peso hasta su salida al mercado 80/100Kg fue efectivo para el control de la infección por *A. pleuropneumoniae* y bacterias gram-negativas y positivas patógenas primarias del pulmón. De esta forma se redujeron los signos clínicos y lesiones así como la difusión intragranja (Campá *et al.*, 2006).

A. pleuropneumoniae no afecta por si sólo una explotación porcina, el sólo diagnóstico serológico y/o microbiológico de él sólo no es suficiente. Otros agentes patógenos responsables de enfermedades como Fiebre Porcina Clásica; Enfermedad de Aujeszky; PRRS; Neumonía Enzoótica y Enfermedad de Glasser contribuyen y complican el control y/o erradicación de *A. pleuropneumoniae* (Ciprián, 1999).

La PP es una de las enfermedades cuya erradicación implica mayor inversión económica y riesgo. Entre los métodos para obtener una explotación libre de *A. pleuropneumoniae* figuran: histerectomía, destete precoz medicado (MEW), despoblación- repoblación y el método suizo.

La histerectomía parece ser el método más seguro para la creación de una explotación libre y para el mantenimiento del estado sanitario, aunque su principal inconveniente es ser un método caro y poco práctico cuando se requiere usar en un número elevado de animales (Taylor, 1999).

El MEW constituye una interesante alternativa a la histerectomía y es ideal para el llenado de explotaciones con animales de alto estado sanitario. Estudios realizados demostraron que la práctica del MEW fue efectiva para la erradicación de *A. pleuropneumoniae* (Alexander y Harris, 1992; Amass, 1998). El llevar a cabo un MEW sin tomar las debidas precauciones de manejo, personal e instalaciones, permitirá la entrada de agentes secundarios los cuales van a causar más pérdidas de producción y por lo tanto pérdidas económicas.

La despoblación y reabastecimiento es sin duda el método más fiable pero implica un costo elevado y puede conllevar a la pérdida de líneas genéticas. Su uso no es justificado cuando solamente se realiza para erradicar la PP (Rodríguez *et al.*, 2002a).

El método Suizo es aplicado para la eliminación de la enfermedad en granjas ya establecidas. Di Cola *et al.*(2006), señalan haber eliminado con éxito la enfermedad después de haber procedido a despoblar todos los animales menores de 10 meses de edad, eliminación de la progenie nacida de hembras reproductoras (con destete de 19 días de edad promedio), limpieza y desinfección a fondo de las instalaciones y

reproducción con animales libres de la bacteria, además de medicar todos los animales con 100 ppm de tiamulina y 300 ppm de clortetraciclina por 4 meses, y a las hembras con una dosis de enrofloxacin inyectable al momento de reiniciar los servicios. A la semana 11 aproximadamente después de la reanudación de los partos, toda la progenie fue medicada por pulsos de 15 días de duración usando 100 ppm de tiamulina y 300 ppm de clortetraciclina. Al evaluar los animales a la edad de 22 semanas con una prueba de ELISA-ApxIV, todos resultaron negativos (Di Cola *et al.*, 2006).

Otros autores sugieren el éxito sólo parcial o aún el fracaso como resultado del uso de este método de erradicación (Taylor, 1999). Las exigencias habituales de evitar los residuos de antibióticos y reducir la resistencia antimicrobiana puede hacerlo poco práctico.

2.10.1. Vacunación

Respecto a la vacunación, podemos distinguir tres tipos de vacunas: las basadas en bacterinas, las de subunidades o las que utilizan cepas atenuadas.

Las bacterinas son preparados del microorganismo completo, inactivados por calor (a 60°C durante 2 horas) o formol (formaldehído 0,2%). La vacunación mediante bacterinas reduce y, en ocasiones, elimina completamente la mortalidad provocada por la infección con serotipos homólogos, pero generalmente no confiere protección heteróloga. Además, no impide ni el desarrollo de lesiones pulmonares ni la colonización por parte del microorganismo (Haesebrouck *et al.*, 1997). La inmunización intramuscular con una vacuna inactivada genéticamente (fantasma) del serotipo 9 de *A. pleuropneumoniae* previno el desarrollo de los signos clínicos y la colonización pulmonar. Sin embargo, faltan más estudios para confirmar estos resultados (Hensel *et al.*, 2000).

Bacterinas con una capacidad de adherencia a los alvéolos incrementada, elaboradas de cultivos bajo condiciones de restricción de la disponibilidad de NAD, demostraron inducir una protección parcial pero superior a aquellas elaboradas con medio de cultivos enriquecidos con NAD (Van Overbeke *et al.*, 2003).

Se ha comprobado que la vacunación con una preparación de ApxI más ApxII obtenida a partir del serotipo 1 de *A. pleuropneumoniae* evitó la mortalidad de los animales inmunizados pero no el desarrollo de las lesiones pulmonares (Devenish *et al.*, 1990). Una vacuna usando la toxina ApxII como antígeno DIVA (diferenciar animales infectados de vacunados) inoculada intramuscular, protegió totalmente contra los síntomas clínicos en ensayos con una cepa homóloga (serotipo 2) así como con una cepa heteróloga (serotipo 9); además, la colonización tonsilar fue reducida pero no suprimida totalmente (Maasa *et al.*, 2006).

En la actualidad se comercializa una vacuna que contiene ApxI, ApxII, ApxIII y una PME de 42 kDa, que genera protección contra todos los serotipos (Van den Bosch *et al.*, 1992). Los ensayos prácticos realizados por Habrun *et al.* (2002) y Satrán *et al.* (2003) confirmó que la vacunación con esta vacuna puede dar lugar a la reducción del índice de mortalidad, de los síntomas clínicos y las lesiones pulmonares reduciendo así considerablemente las pérdidas debido a esta enfermedad, pero sin prevenir la colonización tonsilar.

Una vacuna de subunidad construida de cultivos de *A. pleuropneumoniae* serotipo 2 y 9 cultivadas bajo condiciones de crecimiento deficientes en hierro suprimieron o redujeron fuertemente los síntomas clínicos, pero no previnieron la colonización tonsilar (Goethe *et al.*, 2000). Medrano (2003), construyó una vacuna constituida por Apx I y II y las PME, Tbp1 y Tbp2, que produjo reacción de anticuerpos pero no resultó eficaz en la protección contra la infección por *A. pleuropneumoniae*.

También se han ensayado vacunas basadas en cepas atenuadas. Para obtener estas variantes se han seguido múltiples estrategias: aislamiento de cepas de campo, inactivación por pases *en vitro*, mutagénesis química y mutagénesis dirigida (Medrano, 2003).

El uso de las autovacunas no se fundamenta debido a la poca variación antigénica por parte de los serotipos de *A. pleuropneumoniae*.

A pesar de todo, ninguna vacuna presente en el mercado hasta ahora, es capaz de prevenir que los porcinos alberguen la bacteria a nivel tonsilar y que se conviertan en portadores subclínicos de la infección.

La vacunación está recomendada generalmente para los porcinos de la etapa de acabado, las indicaciones de los laboratorios que producen las vacunas coinciden en vacunar 2 veces a partir de la 6^{ta} semana de edad, dejando un intervalo de 2 a 4 semanas entre cada dosis. Sin embargo, cada granja tiene una situación diferente, los anticuerpos maternos se mantienen presentes en tiempos variables, por lo que es recomendable hacer un perfil serológico para determinar el mejor momento para vacunar. Lo anterior es respaldado por una investigación realizada por López y Mourits (2006) en una granja de flujo continuo infectada, donde los niveles de anticuerpos maternos se mantuvieron hasta las 10 semanas de edad, interfiriendo con la vacunación de los lechones de 6 y 10 semanas de edad.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

El estudio se realizó en 10 granjas porcinas tecnificadas inscritas en la Asociación Peruana de Porcicultores, ubicadas en los departamentos de Arequipa (1), Ica (1), Lima (Lima Norte (4), Lima Sur (1), Lima Este (1) y Lima Oeste (1)) y La Libertad (1). Las muestras de suero se procesaron en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.2. Animales y tamaño de muestra

Para el cálculo del tamaño muestral se utilizó el Teorema del Límite Central, requiriéndose 30 muestras por granja como mínimo, las cuales fueron seleccionadas al azar y distribuidas en 2 grupos según etapa productiva: Gorrinos en crecimiento (entre 60 y 119 días) y en acabado (entre 120 y 154 días).

3.3. Materiales

3.3.1.1. Materiales empleados para el muestreo

- Cajas de tecnopor.
- Tubos vacutainer.
- Agujas vacutainer.
- Soporte (Holder).

- Conservadores de temperatura.
- Algodón.
- Alcohol.

3.3.1.2. Equipos y Materiales de Laboratorio

- Soporte de viales.
- Gradillas.
- Pipetas monocanales y multicanales.
- Tips.
- Viales eppendorf.
- Agua desionizada o destilada.
- Centrifuga.
- Congeladora (-20°C)
- Espectrofotómetro.
- Kit ELISA CHEKIT-APP-ApxIV.

3.4.Recolección de muestras

Las muestras de sangre se tomaron mediante punción de la vena cava anterior, recolectando un volumen de 2 a 3 ml. utilizando el sistema vacutainer. Las muestras fueron rotuladas y trasladadas al Laboratorio de Bacteriología de la FMV-UNMSM. El suero se obtuvo por centrifugación a 3500 RPM por 5 minutos, fue trasladado a viales y conservado a -20°C hasta ser analizado.

3.5.Procesamiento de las muestras

Los sueros fueron analizados con el kit de ensayo inmunoenzimático (ELISA) CHEKIT-APP-ApxIV. Este Kit de ELISA indirecto detecta anticuerpos frente a la toxina ApxIV específica de *A. pleuropneumoniae* y producida por todos los serotipos con una sensibilidad del 95% y una especificidad del 99% (IDEXX), donde la

intensidad del color desarrollado (reacción Ag-Ac) es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos frente a la toxina ApxIV en la muestra.

3.5.1.1. Procedimiento del análisis

3.5.1.1.1. Reactivos

- Placas de microtitulación tapizadas con el antígeno ApxIV recombinante.
- Conjugado antiporcino IgG-PO, unido a peroxidasa.
- Control positivo a *A. pleuropneumoniae*. Suero porcino reactivo frente a la toxina ApxIV, con un 0.1% de azida sódica como conservante.
- Control negativo a *A. pleuropneumoniae*. Suero porcino no reactivo frente a la toxina ApxIV, con un 0.1% de azida sódica como conservante.
- Diluyente de las muestras.
- Solución de lavado concentrada (10X)
- Substrato TMB cromógeno.
- Solución de frenado TMB.

3.5.1.1.2. Preparación de los reactivos y muestras

Se diluyó la solución de lavado concentrada 10X a 1:10 con agua destilada.

3.5.1.1.3. Distribución e incubación de las muestras y controles

Se dispensó 90 ul del diluyente de muestras en los pocillos de la placa, luego se dispensó 10 ul del control positivo en cada uno de los dos primeros pocillos y 10 ul del control negativo en cada uno de los siguientes dos pocillos; 10 ul de las muestras fueron dispensadas en los

pocillos restantes. Se homogenizó el contenido de los pocillos mediante una suave y breve agitación de la placa y se incubó la placa durante 60 minutos a 37 °C en una cámara húmeda. Después de la incubación, se vaciaron los pocillos agitándolos enérgicamente, se lavó cada pocillo con 300 ul de solución de lavado, de 2 a 3 veces. Luego se vaciaron y golpearon enérgicamente las placas contra un papel absorbente para eliminar el contenido líquido.

3.5.1.1.4. Adición e incubación del conjugado

Realizado el lavado se dispensó 100 ul del conjugado en cada pocillo y se incubó nuevamente la placa por 60 minutos a 37 °C en una cámara húmeda. Pasado los 60 minutos de incubación, se realizó el segundo lavado de la placa como se describió en el paso anterior.

3.5.1.1.5. Adición e incubación del sustrato

Se dispensó 100 ul de solución sustrato TMB en cada pocillo, luego se incubó la placa por 15 minutos a temperatura ambiente.

3.5.1.1.6. Adición de la solución de frenado

Luego se dispensó 100 ul de solución de frenado TMB en cada pocillo, siguiendo el mismo orden que la dispensación del sustrato cromógeno.

3.5.1.1.7. Lectura y cálculo de los resultados

La placa fue leída en un lector de microplacas (Bio-tek ELx800) a una longitud de onda de 450 nm. Obtenidos los valores de densidad óptica (DO) se calcularon los resultados de las muestras. La lectura se validó, puesto que el valor de DO para el control positivo fue menor a 2.0 y para

el control negativo menor a 0.5, además la diferencia de valores entre el control positivo y negativo fue mayor igual a 0.3, tal como lo requiere el kit. La DO del control positivo y de las muestras fueron corregidas restándoles el valor de la DO del control negativo:

- Corrección de la DO del control positivo

$$\text{DO pos} - \text{DO neg}$$

- Corrección de la DO de la muestra

$$\text{DO muestra} - \text{DO neg}$$

El valor de cada muestra se calculó en relación al control positivo y negativo con la siguiente fórmula:

$$\text{Valor (\%)} = (\text{DO muestra} - \text{DO neg} / \text{DO pos} - \text{DO neg}) \times 100 \%$$

3.5.1.1.8. Interpretación de los resultados

Las muestras con un valor menor a 30 % fueron consideradas negativas, cuando el valor de las muestras oscilaba entre el 30 y 40 % se consideraban sospechosas y por último se consideraron positivas a las muestras cuyo valor superaba el 40 %.

3.6. Análisis estadístico

Se determinó la frecuencia de muestras seropositivas a *A. pleuropneumoniae* del total de muestras y según las variables: zona y etapa productiva. Para el análisis de la asociación de las variables zona y etapa reproductiva y la frecuencia de muestras seropositivas a *A. pleuropneumoniae* se utilizó el paquete estadístico SPSS, aplicándose la prueba de Chi cuadrado.

IV. RESULTADOS

La técnica de ELISA indirecta detectó anticuerpos contra la toxina ApxIV de *A. pleuropneumoniae* en un 23.7 % de los animales muestreados (71/300) (Cuadro 1 y 2).

La mayor frecuencia de animales seropositivos se encontró en el departamento de Ica con un 60 % (18/30) (Cuadro 1). El análisis de la frecuencia de animales seropositivos a *Actinobacillus pleuropneumoniae* y la zona de procedencia, reveló la existencia de una asociación estadística significativa entre las dos variables ($p < 0.05$).

El mayor porcentaje de animales seropositivos a *Actinobacillus pleuropneumoniae* se presentó en la etapa de crecimiento con un 28.5 % (55/193) (Cuadro 2). Se encontró una asociación estadística significativa ($p < 0.05$) entre las variables etapa productiva y frecuencia de animales seropositivos.

Cuadro 1: Porcentaje de muestras seropositivas a *Actinobacillus pleuropneumoniae* según zonas.

ZONAS	ANIMALES MUESTREADOS	ANIMALES POSITIVOS	FRECUENCIA (%)
Lima Norte	120	25	20.8
Lima Sur	30	5	16.7
Lima Este	30	1	3.3
Lima Oeste	30	10	33.3
Ica	30	18	60.0
La Libertad	30	2	6.7
Arequipa	30	10	33.3
TOTAL	300	71	23.7

Cuadro 2: Porcentaje de muestras seropositivas a *Actinobacillus pleuropneumoniae* según etapa productiva.

ETAPA PRODUCTIVA	ANIMALES MUESTREADOS	ANIMALES POSITIVOS	FRECUENCIA (%)
Crecimiento	193	55	28.5
Acabado	107	16	15.0
TOTAL	300	71	23.7

Cuadro 3: Porcentaje de muestras seropositivas a *Actinobacillus pleuropneumoniae* por la técnica de ELISA indirecta, en las diez granjas muestreadas. (n= 30 animales por granja)

ZONA	GRANJA	ANIMALES POSITIVOS	FRECUENCIA (%)
Lima Norte	1	13	43.3
	2	1	3.3
	3	10	33.3
	4	1	3.3
Lima Sur	5	5	16.7
Lima Este	6	1	3.3
Lima Oeste	7	10	33.3
Ica	8	18	60.0
La Libertad	9	2	6.7
Arequipa	10	10	33.3
TOTAL		71	23.7

Cuadro 4: Porcentaje de muestras seropositivas a *Actinobacillus pleuropneumoniae* según zona y etapa productiva.

ZONA	CRECIMIENTO			ACABADO		
	Animales muestrados	Animales positivos	Frecuencia (%)	Animales muestrados	Animales positivos	Frecuencia (%)
Lima Norte	79	22	27.8	41	3	7.3
Lima Sur	15	4	26.7	15	1	6.7
Lima Este	14	1	7.1	16	0	0.0
Lima Oeste	24	5	20.8	6	5	83.3
Ica	17	17	100.0	13	1	7.7
La Libertad	22	0	0.0	8	2	25.0
Arequipa	22	6	27.3	8	4	50.0
TOTAL	193	55	28.5	107	16	15.0

Cuadro 5: Porcentaje de muestras seropositivas a *Actinobacillus pleuropneumoniae* según la edad de los animales.

ETAPA PRODUCTIVA	EDAD EN SEMANAS	ANIMALES MUESTREADOS	ANIMALES POSITIVOS	FRECUENCIA (%)
CRECIMIENTO	9	44	22	50.0
	10	21	4	19.0
	11	14	1	7.1
	12	34	12	35.3
	13	25	3	12.0
	14	16	3	18.8
	15	17	5	29.4
	16	8	3	37.5
	17	14	2	14.3
ACABADO	18	46	5	10.9
	19	6	5	83.3
	20	25	2	8.0
	21	14	0	0.0
	22	16	4	25.0
TOTAL		300	71	23.7

IV. DISCUSIÓN

Los resultados del Cuadro 1 y Cuadro 2 muestran una frecuencia de animales seropositivos del 23.7 %. Un estudio previo detectó un 76.5% de seropositividad en porcinos beneficiados en un camal de Lima (Castillo, 1996). El menor porcentaje de animales seropositivos encontrado en el presente estudio comparado con los hallazgos de Castillo (1996), podría deberse a la diferencia entre los diseños de monitoreo usados, ya que, los animales muestreados en este estudio fueron de edades diferentes y sin signos de enfermedad respiratoria a diferencia del estudio realizado por Castillo (1996), donde la muestra de sangre fue obtenida al momento del beneficio de porcinos de 4 a 7 meses de edad , que presentaban lesiones de enfermedad respiratoria.

Estudios realizados en otros países han reportado valores superiores al encontrado en este estudio, Brasil con un 48.3% (Moreno *et al.*, 1999), México con un 96.6% (Moguel, 1997) y 100% (Álvarez *et al.*, 2004), EE.UU con un 32.1 % (Schultz *et al.*, 1982) y Turquía (Metiner y Ak, 2007) con un 67.2 %. En Suiza, Nussbaumer *et al.* (2006), detectaron cerca del 40% de granjas comerciales positivas a *A. pleuropneumoniae* utilizando la prueba de ELISA ApxIV.

Tenemos que considerar que la prueba de ELISA usada en este estudio detecta anticuerpos contra la toxina ApxIV, la cual, es exclusiva de *A. pleuropneumoniae*, es producida por todos los serotipos y sólo durante una infección activa, lo que significaría, que los animales detectados positivos con esta prueba estarían infectados con *A. pleuropneumoniae*.

La prueba de ELISA ApxIV tiene la ventaja de no producir reacciones cruzadas con otras especies bacterianas que producen toxinas y proteínas similares, como *E. coli* hemolítica, *A. suis* y *H. parasuis* (Medrano, 2003; Gottschalk, 2004), lo que, podría explicar en parte el menor porcentaje encontrado en este estudio comparado con el estudio de Castillo (1996), así como, con los resultados obtenidos por otros autores (Moguel, 1997; Moreno *et al.*, 1999; Álvarez *et al.*, 2004; Schultz *et al.*, 1982 y Metiner y Ak, 2007), quienes utilizaron pruebas distintas a la usada en este estudio. Sin embargo, más importante que lo referido a las características de las pruebas usadas, es la propia dinámica de la infección, que depende, del distinto manejo de los animales y de la introducción de porcinos con infección subclínica en cada granja.

Se sabe que la presencia de infección por *A. pleuropneumoniae* está asociada a granjas porcinas con sistemas de crianza intensiva, esto coincide con los resultados encontrados en este estudio, ya que, las diez granjas porcinas de crianza intensiva muestreadas, resultaron positivas a la infección (Cuadro 3).

A medida que los sistemas de producción porcina se intensifican, las granjas aumentan la densidad de animales por corral e incrementan el ingreso de animales de reemplazo. Generalmente, las granjas porcinas comerciales no realizan pruebas diagnósticas para el descarte de *A. pleuropneumoniae* en los animales de reemplazo, y teniendo en cuenta que la introducción de marranas de reemplazo portadoras de *A. pleuropneumoniae* es uno de los puntos claves en la introducción del agente a una granja (Wongnarkpet *et al.*, 1999), junto con la detección del agente en estudios previos realizados en granjas del departamento de Lima (Castillo, 1996 y Calle, comunicación personal), el hecho de haber encontrado animales seropositivos en las granjas muestreadas era algo esperado.

Como se puede observar en el Cuadro 1, la granja de la zona de Ica mostró el mayor porcentaje de seropositividad con un 60 %. Todas las granjas porcinas de crianza intensiva realizan un manejo similar de los animales. Sin embargo, en granjas multisitios, como el caso de la granja de Ica, las prácticas de manejo incluyen una mayor mezcla de los animales, debido al traslado y movimiento de éstos de un sitio a otro, así como, a la reagrupación que se realiza según edad, peso o tamaño en las etapas

de recría, crecimiento y acabado. Se sugiere que este tipo de manejo permite un mayor contacto directo entre animales infectados y susceptibles, aumentando el riesgo de infección, lo cual podría explicar el mayor porcentaje de animales seropositivos encontrados en esta granja, a pesar que en este tipo de granjas el sistema multisitios implica un mayor nivel de bioseguridad.

García (2007), detectó la infección con *A. pleuropneumoniae* en un 94.1% de madres provenientes de una granja en el departamento de Ica, sugiriendo que los lechones podrían infectarse durante la etapa de lactación. En consecuencia, al realizar un agrupamiento de estos animales en la etapa de recría, se facilitaría la transmisión del agente de los animales infectados a los susceptibles. Vigre *et al.* (2002), demostraron que la seroconversión ocurre entre las 2 a 4 semanas post infección, según esto, los animales que se infecten en la etapa de recría (4 a 7 semanas de edad) comenzarían a presentar anticuerpos entre las 6 y 8 semanas de edad.

En base a la información anteriormente descrita y a lo hallado por Haesebrouck *et al.* (1997), quienes señalaron que el nivel máximo de anticuerpos se daba entre las 3 a 4 semanas post infección pudiendo perdurar estos anticuerpos por varios meses, esperaríamos encontrar altos niveles de anticuerpos, debida a una infección, en los animales en la etapa de crecimiento. Lo que explicaría los resultados del Cuadro 2, donde podemos observar que un 28.5 % de los animales de la etapa de crecimiento (9 a 17 semanas de edad) fueron seropositivos a diferencia de lo hallado en la etapa de acabado, donde solamente el 15 % de los animales presentaron anticuerpos.

Para poder explicar el menor porcentaje de animales positivos encontrado en los animales de acabado (18 a 22 semanas de edad) tenemos que considerar que la seroconversión a *A. pleuropneumoniae* depende del momento en que se de la infección, que a su vez, está sujeto al comportamiento del agente en cada granja y al manejo que realice ésta. Debido a esto, podemos encontrar variaciones en el momento de seroconversión en animales de diferentes edades.

A las 9 semanas de edad un 50 % de los animales presentaron anticuerpos contra *A. pleuropneumoniae* manteniéndose la seropositividad en un menor porcentaje hasta el

final de la etapa de crecimiento (Cuadro 5). Debido a que los anticuerpos de origen maternal pueden perdurar en algunos casos hasta por 12 semanas, así como, al diseño del estudio y a la prueba de ELISA usada, se nos hace difícil diferenciar los anticuerpos de origen maternal de los de una infección, por lo cual, no podemos afirmar que este 50 % de seropositividad sea en su totalidad debida a una infección activa. En todo caso, podríamos estar frente a una fuerte transferencia de la inmunidad pasiva que equivaldría a una presumible circulación de la bacteria en el hato reproductor, que concordaría con lo encontrado por García (2007), quien detectó la infección en las madres.

Pese a esto, basándonos en un estudio realizado por Haesebrouck *et al.* (1997), donde encontraron que la protección proporcionada por los anticuerpos maternos no supera las 3 semanas, así como, en que la prueba de ELISA usada detecta generalmente anticuerpos a partir de las 3 semanas postinfección (Dreyfus *et al.*, 2004), y por último, en el estudio efectuado por Chiers *et al.* (2002), en el cual los autores determinaron que los animales se tornan susceptibles a la infección a partir de las 8 semanas de vida. Podemos sugerir que la seropositividad encontrada a partir de las 9 semanas de edad puede ser consecuencia de una probable infección activa.

Cabe señalar, que tanto los animales de la etapa de crecimiento de la granja de La Libertad como los animales de la etapa de acabado de la granja de la zona Este de Lima no seroconvirtieron (Cuadro 4), lo que no indica que la infección no esté presente en la granja, sino que posiblemente estos animales sean portadores de la bacteria o que no estén infectados. Los animales que se hicieron portadores a nivel nasal y/o tonsilar de *A. pleuropneumoniae* sin una infección previa podrían no mostrar anticuerpos contra la toxina ApxIV (Schaller *et al.*, 1999), por lo tanto, estos animales no serían detectados por la prueba de ELISA usada.

Los resultados confirman la presencia de la infección con *A. pleuropneumoniae* no sólo en granjas porcinas a nivel de Lima, sino también en otros departamentos del Perú. Es importante tener en cuenta que las infecciones subclínicas pueden pasar desapercibidas durante años en las explotaciones infectadas y que, este proceso se debe a distintos factores inherentes al agente, entre los cuales, la patogenicidad diferencial de

los distintos serotipos juega un rol fundamental, así como, las condiciones de manejo de las explotaciones y el desarrollo de la inmunidad poblacional.

V. CONCLUSIONES

- El 23.7 % (71/300) del total de animales muestreados presentaron anticuerpos contra la toxina ApxIV de *A. pleuropneumoniae*.
- Todas las granjas de las siete zonas muestreadas fueron seropositivas a *A. pleuropneumoniae*. El mayor porcentaje de seropositividad se presentó en la zona de Ica con un 60 %.
- Según la etapa de producción de los animales, se encontró un 28.5 % de animales seropositivos en la etapa de crecimiento y un 15 % en la etapa de acabado, pudiéndose concluir que la etapa de crecimiento es la de mayor riesgo de infección, existiendo en las dos etapas productivas circulación de *A. pleuropneumoniae*.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Alexander T.L; D.L.Harris. 1992. Disease of Swine: Methods of disease control. In: A.D. Leman, et al. Ed 7. *Iowa State University Press*. EE.UU.p. 893.
2. Álvarez, M; J. Rodríguez; A. Ciprian; L. Rodríguez; G. Ayora y J. Segura. 2004. Perfil serológico del virus de influenza porcina, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*, en granjas de Yucatán, México. *Vet. Mex.*35 (4):295-305.
3. Amass, S.1998. Swine Respiratory Diseases: A Review. Y The Effect of Wean Age on Pathogen Removal. Memorias del VII Día del Porcicultor- México. p. 6-20.
4. Andreasen M.; J.P. Nielsen; P.Baekbo; P.Willeberg; A. Botner.2000. A longitudinal study of serological patterns of respiratory infections in nine infected Danish swine herds. *Prev Vet Med.* 45(3-4):221-35.
5. Andresen, L.O.; J. Klausen; K. Barfod; V. Sorensen. 2002. Detection of antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 12 in pig serum using a blocking enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Microbiol.* 89: 61–67.
6. Archambault M; J. Labrie J; C.R. Rioux; F. Dumas; P.Thibault; C. Elkins; M. Jacques. 2003. Identification and preliminary characterization of a 75-kDa hemin- and hemoglobin-binding outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Can. J. Vet. Res.*67 (4):271-7.

7. Baltes, N. 2002. The role of iron in *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection: Identification and in vivo characterization of virulence-associated genes. *Institute for Microbiology School of Veterinary Medicine Hannover*. Alemania.
8. Bandara, A.; M. Lawrence; H. Veit y T. Inzana. 2003. Association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Capsular Polysaccharide with Virulence in Pigs. *Infect. Immun.* 71(6): 3320–3328.
9. Bersano, J.G; E.M.C. Villalobos; R.M. Monteiro. 2003. Prevalencia do *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* em suínos no Brasil. *Arq.Inst.Biol.* 70 (2):251-253.
10. Blackall, P.J.; H.I.B.M. Klaasen; H. Van Den Bosch; P. Kuhnert; J. Frey. 2002. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Vet. Microbiol.* 81:47-52.
11. Boekema, B.K. ; E.M. Kamp; M.A. Smits; H.E. Smith; N. Stockhofe-Zurwieden. 2004. Both ApxI and ApxII of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 are necessary for full virulence. *Vet. Microbiol.* 100: 17-23.
12. Bossé, J.T; R.P. Johnson; S. Rosendals. 1990. Serodiagnosis of pleuropneumonia using enzyme-linked immunosorbent assay with capsular polysaccharide antigens of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, 5 and 7. *Can. J. Vet. Res.* 54: 427-431.
13. Bossé, J.T.; R.P. Johnson; M. Nemec; S. Rosendal. 1992. Protective local and systemic antibody responses of swine exposed to an aerosol of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect. Imm.* 60:479–484.
14. Bosse', J.T.; R. Friendship; S. Rosendal; B.W. Fenwick. 1993. Development and evaluation of a mixed ELISA for serodiagnosis of *Actinobacillus*

- pleuropneumoniae* serotypes 1, 5 and 7 infections in commercial swine herds. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5: 359–362.
15. Bossé, J.T. y J.I. MacInnes. 2000. Urease activity may contribute to the ability of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to establish infection. *Can. J. Vet. Res.* 64:145-150.
 16. Bossé, J.T.; H. Janson; B.J. Sheehan; A.J. Beddek; A.N. Rycroft; J.Simon Kroll; P.R. 2002. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. Langford. *Microbes. Infect.* 4:225-235.
 17. Calle, S; Camacho, C; Urtega, L. 1996. Detección de anticuerpos contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* en granjas porcinas en Lima. *XIII Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias*, Lima.p.231.
 18. Campá, M.; H. Baldovino; C.Péndola; P. Fernández; D. Macagno; J. Cappuccio; C.J. Perfumo. 2006. Procedimientos para la obtención y mantenimiento de una granja libre de *Actinobacillus Pleuropneumoniae* a partir de una granja positiva. *Vº Congreso de Producción Porcina del MERCOSUR*, Argentina.
 19. Castillo, C. 1996. Aislamiento y determinación de serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en porcinos beneficiados en camal de Lima. Tesis. *Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo-Facultad de Medicina Veterinaria*, Chiclayo.p.38.
 20. Chang, Ch-F.; T-M. Yeh; Ch-Ch. Chou; Y-F. Chang; T-Sh. Chiang. 2002. Antimicrobial susceptibility and plasmid analysis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated in Taiwan. *Vet. Microbiol.* 84: 169–177.
 21. Chatellier, S.; J. Harel; D. Dugourd; B. Chevallier; M. Kobisch; y M. Gottschalk. 1999. Genomic relatedness among *Actinobacillus pleuropneumoniae* field strains of serotypes 1 and 5 isolated from healthy and diseased pigs. *Can. J. Vet. Res.* 63 (3): 170–176.

22. Chiers, K.; F. Haesebrouck; I. van Overbeke; G. Charlier; R. Ducatelle. 1999. Early in vivo interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with tonsils of pigs. *Vet. Microbiol.* 68:301-306.
23. Chiers, K.; I. Van Overbeke; E. Donne; M. Baele; R. Ducatelle; T. De Baere y F. Haesebrouck. 2001. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in cultures from nasal and tonsillar swabs of pigs by a PCR assay based on the nucleotide sequence of a dsbE-like Gene. *Vet. Microbiol.* 83 :(2) 147-159.
24. Chiers, K.; E. Donné; I. Van Overbeke; R. Ducateller; F. Haesebrouck. 2002. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in closed swine herds: infection patterns and serological profiles. *Vet. Microbiol.* 85 (4):343-352.
25. Cho, W-S.; C. Chae. 2003a. Differentiation of twelve *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes by outer membrane lipoprotein gene-based restriction fragment length polymorphism. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* 50: 90–94.
26. Cho, W-S. y C. Chae. 2003b. PCR detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* apxIV gene in formalin-fixed, paraffin-embedded lung tissues and comparison with in situ hybridization. *Lett. Appl. Microbiol.* 37: 56–60.
27. Ciprián, C.A. 1999. Impacto del diagnóstico serológico de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en las diferentes prácticas de destete. Memorias de Enfermedades Infecciosas en el Cerdo de la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en cerdos de los Altos de Jalisco.p. 28-45.
28. Ciprián, C.A.; E.S. Mendoza; S.T. Cruz; V.G. Colmenares; R.A. Romero. 1999. Sistema rápido para el diagnóstico serológico de App- Hps -Pm -Mh denominado NEUMOTESTmr. (marca registrada unam). Memorias del VIII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (ALVEC) y VII Congreso Organismo Iberoamericano de Porcicultura (OIP). México.

29. Clark, L.K; K.E. Knox; y C.C. Wu.1999. Evaluation of the Recrudescence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Growing Pigs Following Pulmotil Treatments in Nursery and Grower.*Swine Day*.31:60-65.
30. Cruijssen, T.; L.A. van Leengoed; M. Ham-Hoffies; J.H. Verheijden.1995. Convalescent pigs are protected completely against infection with a homologous *Actinobacillus pleuropneumoniae* strain but incompletely against a heterologous-serotype strain. *Infect. Immun.*63: 2341–2343.
31. Delventhal, S.; A. Hensel; K. Petzoldt y R. Pabst. 1992. Cellular changes in the bronchoalveolar lavage (BAL) of pigs, following immunization by the enteral or respiratory route.*Clin. Exp. Immunol.* 90: 223-227.
32. Di Cola G.; A. Carranza; A. Ambrogil y P. Tamiozzo. 2006. Intento de erradicación de pleuropneumonia contagiosa porcina en descendencia de hembras en establecimiento en confinamiento. Vº Congreso de Producción Porcina del MERCOSUR, Argentina.
33. Diosdado, F.; D. Córdova; G. Socci; D. González; A. Morilla. 1999. Sinergismo potencial entre el virus de la Enfermedad de Aujeszky, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* en cerdos de engorda. *Téc. Pecu Méx.*37:23-30.
34. Diosdado, F.; D. González; L.P. Moles-Cervántes y A. Morilla. 2004. Asociación entre anticuerpos contra el virus del síndrome disgénésico y respiratorio porcino y anticuerpos contra otros patógenos. *Vet. Mex.* 35(2): 147-152.
35. Dreyfus, A.; A. Schaller; S. Nivollet, R.P.A.M. Segers; M. Kobisch; L. Mieli, V. Soerensen; D. Hussy; R. Miserez; W. Zimmermann; F. Inderbitzin; J. Frey. 2004. Use of recombinant ApxIV in serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections, development and prevalidation of the ApxIV ELISA. *Vet. Microbiol.* 99:227-238.

36. Dubreuil, D.; M. Jacques; K. Mittal y M. Gottschalk. 2000. *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. *Anim Health Res Rev.*1 (2); 73–93.
37. Duff, J.P., W. Scott, M. Wilkes; B. Hunt. 1996. Otitis in a weaned pig: a new pathological role for *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Vet. Rec.* 139: 561-563.
38. Estrada.R.1996."Neumonía por Mycoplasma y Pleuroneumonia porcina". Asociación Peruana de Porcicultores, Boletín Informativo Octubre 1996.IV *Seminario Internacional de Porcicultura*, Lima-Perú.pág.3.
39. Enríquez, I.; AL. Guerrero; JJ. Serrano; D. Godinez; JL. Rosales; V. Tenorio; M. de la Garza. 2004. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine-lung collagen. *Microbiology.*150:2391-400.
40. Frey, J.1995. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol.*3 (7):257-261.
41. Fussing, V, K. Barfod; R. Nielsen; K. Moller;J.P. Nielsen;H.C. Wegener; M. Bisgaard.1998. Evaluation and application of ribotyping for epidemiological studies of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Denmark. *Vet. Microbiol.* 62 (2):145-62.
42. Fussing, V. 1998. Genomic relationships of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 strains evaluated by ribotyping, sequence analysis of ribosomal intergenic regions, and pulsed-field gel electrophoresis. *Lett. Appl. Microbiol.* 27: 211–215.
43. García, O. 2007. Persistencia de la inmunidad pasiva contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* en porcinos en etapa de recría. Tesis Pregrado. Facultad de Medicina Veterinaria –Universidad Nacional Mayor de San Marcos.Lima.64p.

44. García-Cuellar, c., c. Montañés; V. Tenorio; J. Reyes-Esparza; M.J. Duran; E. Negrete-Abascal; A. Guerrero y M. de la Garza. 2000. A 24-kDa cloned zinc metalloprotease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* is common to all serotypes and cleaves actin in vitro. *Can. J. Vet. Res.* 64: 88-95.
45. Goethe R, Gonzales OF, Lindner T, Gerlach GF. 2000. A novel strategy for protective *Actinobacillus pleuropneumoniae* subunit vaccines: detergent extraction of cultures induced by iron restriction. *Vaccine.* 9(7/8):966–75.
46. González; O.; R. García; M. de la Garza; S. Vaca; G.L. Paniagua; R. Mejía; V. Tenorio; E. Negrete Abascal. 2004. *Actinobacillus pleuropneumoniae* metalloprotease: cloning and in vivo expression. *FEMS Microbiol. Lett.* 234: 81–86.
47. Gottschalk, M., F. De Lasalle; S. Radacovich and D. Dubreuil. 1994a. Evaluation of long chain lipopolysaccharides (LC-LPS) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 for the serodiagnosis of swine pleuropneumonia *Vet. Microbiol.* 38: 315-327.
48. Gottschalk, M., E. Altman; N. Charland, F. De Lasalle and D. Dubreuil. 1994b. Evaluation of a saline boiled extract, capsular polysaccharides and long-chain polysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 as antigens for the serodiagnosis of swine pleuropneumonia. *Vet. Microbiol.* 42:91-104.
49. Gottschalk, M; E. Altman; S. Lacouture, F. De Lasalle; y J.D. Dubreuil. 1997. Serodiagnosis of Swine Pleuropneumonia due to *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotypes 7 and 4 Using Long-Chain Lipopolysaccharides. *Can. J. Vet. Res.* 6(1):62-65.
50. Gottschalk, M.; A. Broes; K.R. Mittal; M. Kobisch; P. Kuhnert; A. Lebrun; J. Frey. 2003. Non-pathogenic *Actinobacillus* isolates antigenically and

- biochemically similar to *Actinobacillus pleuropneumoniae*: a novel species? *Vet. Microbiol.* 92: 87–101.
51. Gottschalk, M. 2004. Avances recientes en el diagnóstico y el control de la pleuropneumonía porcina. *Revista Mundo ganadero*. 170. Acceso: <http://www.exopol.com/general/circulares/103circ.html>
 52. Gottschalk, M. 2005. Tendencias actuales en el Control de *Actinobacillus Pleuropneumoniae*, *Haemophilus Parasuis* y *Streptococcus Suis*. *Av. Tecnol. porc.* 2 (1): 17 – 38.
 53. Gram, T.; P. Ahrens; M. Andreasen y J.P. Nielsen. 2000. An *Actinobacillus pleuropneumoniae* PCR Typing System Based on the *apx* and *omlA* Genes Evaluation of Isolates from Lungs and Tonsils of Pigs. *Vet. Microbiol.* 75: 43-57.
 54. Grondahl, J.; K. Barfod; J. Klausen; L.O. Andresen; P. M.H. Heegaard; V. Sorensen. 2003. Development and evaluation of a mixed long-chain lipopolysaccharides based ELISA for serological surveillance of infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2, 6 and 12 in pig herds. *Vet. Microbiol.* 96: 41–51.
 55. Gunn-McQuillan, H. 2005. Prevalence and significance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus suis* in Ontario. *American Association of Swine Veterinarians*. p 55-62.
 56. Gutiérrez, C.B.; J.I. Rodríguez; J. Suárez; R.I. Tascón y E.F. Rodríguez. 1993. Evaluation of an Immunoperoxidase Technique using an only Biotin-Labeled Antibody for the Demonstration of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Tissue Sections. *J. Vet. Med.* B40: 81-88.
 57. Gutiérrez, C.; J. Suárez; O.R. González y E.F. Rodríguez. 1997. Epidemiología y Formas Clínicas. *Porci.* 37: 47-59.

58. Gutiérrez, C. B.; N. García del Blanco; M. Blanco; J. Navas; E.F. Rodríguez. 2006. Changes in antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in Spain during the last decade. *Vet. Microbiol.* Article in press. Acceso: <http://www.sciencedirect.com>
59. Habrun, B.; V. Bilić; Ž. Cvetnić; A. Humski; M. Benić. 2002. Porcine pleuropneumonia: the first evaluation of field efficacy of a subunit vaccine in Croatia. *Vet. Med. – Czech.* 47 (8): 213–218.
60. Haesebrouck, F.; K. Chiers; I. Van Overbeke; R. Ducatelle. 1997. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Vet. Microbiol.* 58: 239-249.
61. Hensel, A.; R. Pabst; S. Bunka; K. Petyold. 1994. Oral and aerosol immunization with viable or inactivated *Actinobacillus pleuropneumoniae* bacteria: antibody response to capsular polysaccharides in bronchoalveolar lavage fluids (BALF) and sera of pigs. *Clin. Exp. Immunol.* 96: 91–97.
62. Hensel, A.; V. Huter; A. Katinger; P. Raza; C. Strnistschie; U. Roesler; E. Brand; W. Lubitz. 2000. Intramuscular immunization with genetically inactivated (ghosts) *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 protects pigs against homologous aerosol challenge and prevents carrier state. *Vaccine.* 18: 2945-2955.
63. Hernández, R.; G. Chávez, J.A. Gutiérrez. 2002. Identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotipo 1, serotipo 1, de pulmones de cerdo con y sin lesiones neumónicas utilizando la técnica de inmunohistoquímica. *Veterinaria México* .33 (4): 355-362.
64. Hüßy, D.; Y. Schlatter; R. Miserez; T. Inzana; J. Frey. 2004. PCR-based identification of serotype 2 isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovars I and II. *Vet. Microbiol.* 99:307–310.

65. IDEXX. Laboratories. Koolhovenlaan 20, 1119 NE Schiphol-Rijk – The Netherlands.
66. Inzana, T y B. Mathison. 1987. Serotype specificity and immunogenicity of the capsular polymer of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.* 55(7): 1580–1587.
67. Inzana, T. J.; G. F. Clark; y J. Todd. 1990. Detection of serotype-specific antibodies or capsular antigen of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by a double-label radioimmunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 28:312–318.
68. Inzana, T. y B. Fenwick. 2001. Serologic Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Swine by Capsular Polysaccharide-Biotin-Streptavidin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Clin. Microbiol.* 39 (4): 1279–1282.
69. Jacques, M. 1996. Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. *Trends Microbiol.* 4:408–410.
70. Jaglic, Z.; P. Svastova; I. Rychlik; K. Nedbalcova; Z. Kucerovala; I. Pavlik; M. Bartoš; M. Bartos. 2004. Differentiation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR-REA based on sequence variability of the apx IVA gene and by ribotyping. *Vet. Microbiol.* 103 (1/2): 63-69.
71. Jensen, T.K.; M. Boye; T. Hagedorn-Olsen; HJ. Riising; O. Angen. 1999. *Actinobacillus pleuropneumoniae* osteomyelitis in pigs demonstrated by fluorescent in situ hybridization. *Vet Pathol.* 36 (3):258-61.
72. Jessing S.; O. Angen; T.J. Inzana. 2003. Evaluation of a multiplex PCR test for simultaneous identification and serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2, 5 and 6. *J. Clin. Microbiol.* 41:4095-4100.

73. Jobert, J.; Ch. Savoye, R. Cariolet, M. Kobisch, y F. Madec.2000. Experimental aerosol transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to pigs. *Can. J. Vet. Res.*64:21-26.
74. Kilian, M.; J. Nicolet; y E. L. Biberstein. 1978. Biochemical and serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (Matthews and Pattison 1961) Shope 1964 and proposal of a neotype strain. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28: 20–26.
75. Klausen, J.; L.O. Andresen; K. Barfod; V. Sørensen. 2001. Blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 6 in pig serum. *Vet. Microbiol.* 79:11–18.
76. Klausen, J.; L.O. Andresen; K. Barfod; V. Sørensen. 2002. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for serological surveillance of infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 in pig herds. *Vet. Microbiol.* 88: 223-232.
77. Krejci J, Nechvatalova K, Kudlackova H, Faldyna M, Kucerova Z, Toman M. 2005.Systemic and Local Antibody Responses after Experimental Infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Piglets with Passive or Active Immunity. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public. Health.*52 (4):190-6.
78. Kristensen, C.S.; O. Angen; M. Andreasen; H. Takai; J.P. Nielsen; S.E. Jorsal. 2004. Demonstration of airborne transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 between simulated pig units located al close range. *Vet. Microbiol.* 98: 243-249.
79. Kucerova, Z.; Z. Jaglic; R. Ondriasova; K. Nedbalcova. 2005. Serotype distribution of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from porcine pleuropneumonia in the Czech Republic during period 2003–2004. *Vet. Med. – Czech.* 50 (8): 355–360.

80. Lauritzen, B.; J. Lykkesfeldt; C. Friis. 2003. Evaluation of a single dose versus a divided dose regimen of danofloxacin in treatment of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Res. Vet. Sci.* 74:271–277.
81. Leiner, G.; B. Franz; K. Strutzberg y G.F. Gerlach. 1999. A novel enzyme-linked Immunosorbent assay using the recombinant *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxII antigen for diagnosis of pleuropneumonia in pig herds. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6 :(4) 630-632.
82. Lo, T. 1997. Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 by multiplex polymerase chain reaction. Tesis de Maestria. Instituto Politécnico y Universidad Estatal de Virginia.
83. Loftager, M.K.; L. Eriksen; R. Nielsen. 1993. Antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in mucosal secretions and sera of infected pigs as demonstrated by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Res Vet Sci.* 54(1):57-62.
84. Lombin, L. H., S. Rosendal and W. R. Mitchell. 1982. Evaluation of the complement fixation test for the diagnosis of pleuropneumoniae of swine caused by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can. J. Comp. Med.* 46:109-114.
85. López J.V. y B. Mourits. 2006. Long term persistence of maternally derived antibodies against Apx toxins in a herd in Spain enzootically infected with app serotype 5. *Proceedings of the 19th IPVS Congress.* 2:250.
86. Maasa A.; J. Meens; N. Baltes; I. Hennig-Pauka; G-F. Gerlach. 2006. Development of a DIVA subunit vaccine against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Vaccine.* Article in press. Acceso: <http://www.sciencedirect.com>.

87. Madsen, L.W.; M. Boye; T.K. Jensen y B. Svensmark. 2001. *Actinobacillus pleuropneumoniae* Demonstrated in situ in Exudative Meningitis and Nephritis. *Vet. Rec.* 149(24):746-747.
88. Maes, D. G.; H. Laevens; M. Verdonck; A. De Kruif; K. Chiers y F. Haesebrouck. 2002. Seroprevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 2, 3 and 9 in slaughter pigs from Belgian fattening farms. *Vet. Rec.* 151 (7): 206-210.
89. Maldonado, J.; P. Riera; E. Martínez; D. Llopart; C. R. Osorio; C. Artigas. 2004. Nad-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* implicated in the etiology of fatal swine pleuropneumonia. *Proceedings of the 18th IPVS Congress*.1:159.
90. Marsteller, T. y B. Fenwick. 1999. *Actinobacillus pleuropneumoniae* disease and serology. *Swine Health Prod.* 7 (4):161-165.
91. Medrano, A. 2003. Expresión recombinante en *E. coli* de antígenos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* para vacunación y diagnóstico. Tesis Doctorado. Instituto de Biotecnología y Biomedicina. Universidad Autónoma de Barcelona, España.
92. Metiner, K y S. Ak. 2007. Presence and seroprevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs in Turkey. *Acta Vet. Brno.* 76: 237-244.
93. Mittal, K.R.; R. Higgins y S. Larivière .1983. Detection of type specific antigens in the lungs of *Haemophilus pleuropneumoniae* infected pigs by coagglutination test. *J. Clin. Microbiol.* 18: 1355–1357.
94. Mittal, K.R.; S. Bourdon y M. Berrouard. 1993. Evaluation of counter immunoelectrophoresis for serotyping *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates and detection of type specific antigens in lungs of infected pigs. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2339–2342.

95. Moguel J.R.1997. Seroprevalencia y descripción de algunas variables relacionadas a la presentación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en granjas porcinas de Yucatán. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina veterinaria y Zootecnia .Universidad Autónoma de Yucatán. México.p.67
96. Montaraz, J.; B. Fenwick; H. Hill and M. Rider. 1996. Evaluating antibody isotype-specific ELISA, complement fixation, and ApxI hemolysin neutralization tests to detect antibodies in pigs infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Swine Health and Production*. 4:79-84.
97. Moredo, F. A.; M.F. Landoni; C. J. Perfumo. 2001. Concentración inhibitoria mínima de tilmicosina y eritromicina frente a cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* aisladas en la República Argentina. *Analecta Veterinaria*.21 (2): 6-11.
98. Moreno, A.M.; O Barbarini.; Baccaro M.R. 1999.Levantamento sorológico para *Actinobacillus pleuropneumoniae* em criações de suínos no período de dezembro de 1996 a julho de 1999. In: IX Congresso Brasileiro De Veterinários Especialistas Em Suínos. Resumos, Belo Horizonte: p.161.
99. Nechvatalova, K.; P. Knotigova; J. Krejci; M. Faldyna; E. Gopfert;P. Satran; M. Toman. 2005. Significance of different types and levels of antigen-specific immunity to *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in piglets. *Vet. Med. – Czech*. 50 (2): 47–59.
100. Nedbalcova, K.; P. Satran; Z. Jaglic; R. Ondriasova; Z. Kucerovala. 2005. Monitoring of antibiotic resistance in isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the Republic Czech between 2001 and 2003. *Vet. Med. – Czech*. 50 (5): 181–185.
101. Negrete-Abascal, E.; V.R. Tenorio; J.J. Serrano; C. García y M. de la Garza. 1994. Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1

- degraded porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A .*Can. J. Vet. Res.* 58: 83-86.
102. Negrete-Abascal, E.; M. E. Reyes; R. M. García; S. Vaca; J. A. Girón; O. García; E. Zenteno; y M. de la Garza. 2003. Flagella and motility in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Bacteriol.* 185 (2): 664-668.
 103. Nicolet, J., M. Krawinkler, and A. Baumgartner. 1981. An enzyme-linked immunosorbent assay, using an EDTA-extracted antigen for the serology of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* 42:2139-2142.
 104. Nielsen, R., T. Plambeck; N.T. Foged. 1991. Blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2. *J. Clin. Microbiol.* 29, 794–797.
 105. Nielsen, R., T. Plambeck; N.T. Foged. 1993. Blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 8. *Vet. Microbiol.* 34, 131–138.
 106. Nielsen, R., L.O. Andressen, T. Plambeck, J.P. Nielsen, L. Krarup, S.E Jorsal. 1997. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from pigs in two Danish herds. *Vet. Microbiol.* 54: 35 - 46.
 107. Nielsen, R.; J.F. van den Bosch; T. Plambeck; V. Sorensen; J.P. Nielsen. 2000. Evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to the Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 71: 81-87.
 108. Nussbaumer, I; R. Miserez; W. Zimmermann. 2006. The seroprevalence of *Actinobacillus Pleuropneumoniae* in swiss pig herds- A study with the ApxIV Elisa. *Proceedings of the 19th*.

109. Olander, H. J. 1963. A septicemic disease of swine and its causative agent *Haemophilus paraahaemolyticus*. Tesis de Postgrado. Universidad de California.
110. Palomo A. 1996. Pleuroneumonía porcina. *Av. Tecnol. porc.* 3 (1): 27 – 32.
Acceso: <http://www.avancesentecnologiaporcina.com/contenidos/pleene6.htm>
111. Paradis, M.A.; G.H. Vessie; J.K. Merrill; C.P. Dick; C. Moore; G. Charbonneau; M. Gottschalk; J.I. MacInnes; R. Higgins; K.R. Mittal; C. Girard; J.J. Aramini; J.B. Wilson. 2004. Efficacy of tilmicosin in the control of experimentally induced *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in swine. *Can. J. Vet. Res.* 68 (1):7-11.
112. Pattison, I. H.; D. G. Howell; y J. Elliott. 1957. A *Haemophilus*-like organism isolated from pig lung and the associated pneumonic lesions. *J. Comp. Pathol.* 67:320–329.
113. Pineda, Y.; A. de López; F. de Aponte; C. de Parra y J. Santander. 1996. Serotipos de *Actinobacillus Pleuropneumoniae* aislados de cerdos en Venezuela y su susceptibilidad a los agentes antimicrobianos. *Veterinaria Tropical* .21(1): 35-47.
114. Pohl, S.; H.U. Bertschinger; W. Frederiksen y W. Mannheim. 1983. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-like organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33: 510-514.
115. Radostits, O.M.; C.C. Gay; D.C. Blood; K.W. Hinchcliff. 2001. Medicina Veterinaria: Tratado de las Enfermedades del Ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9º Ed, Vol I, p.1064-1071.

116. Rodríguez-Ferri, E.; Gómez, S. y Sanchez-Vizcaíno. 2002a *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Curso Digital de Enfermedades Infecciosas Porcinas. Acceso: <http://www.3tres3.com>.
117. Rodríguez, E.; C. Gutiérrez; V. de la Puente; N. García; J.L. Monter; M.L. del Río; N.García; M. Blanco; J. Navas y N. Ladrón. 2002b. Pleuropneumonía porcina. *Información Veterinaria*.234:35-44.
118. Rodríguez-Ferri, EF. 2003. Conferencia: Sobre la virulencia de algunos patógenos respiratorios porcinos. Real Academia de Ciencias Veterinarias. Acceso:<http://www.racve.es/actividades/medicina-veterinaria/2003-12-03EFRodriguezFerri.htm>
119. Rosales, C. 2005. Pleuroneumonía contagiosa porcina. Simposium Internacional de Nutrición y Sanidad porcina. 114-120.
120. Rycroft, A. y L. H. Garside.2000. *Actinobacillus* species and their role in animal disease.*The Veterinary Journal*.159:18-36.
121. Satrán P.; K. Nedbalcová; Z. Kuãerová.2003.Comparison of Protection Efficacy of Toxoid and Whole-Cell Vaccines Against Porcine Pleuropneumonia Caused by Endotracheal Infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Acta Vet. Brno*. 72: 213-219.
122. Sauer F.; M. Mulvey; J. Schilling; J. Martinez; S. Hultgren.2000.Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis. *Curr. Opin.Microbiol*. 3: 65–72.
123. Schaller, A. ; R. Kuhn; P.Kuhnert ; J. Nicolet ; T. Anderson; J. MacInnes; R P.A M. Segers y J. Frey.1999. Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology*.145: 2105–2116.
124. Schaller, A.; S.P. Djordjevic; G.J. Eamens; W.A.Forbes; R. Kuhn; P. Kuhnert; M. Gottschalk; J. Nicolet y J. Frey. 2001. Identification and Detection of

- Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR Based on the Gene *apxIVA*. *Vet. Microbiol.* 79: 47-62.
125. Schultz, RA; T.A. Young; D.F. Ross; D.R. Jeske.1982.Prevalence of antibodies to *Haemophilus pleuropneumoniae* en Iowa swine.*Am J Vet Res.* 43:1848-1851.
 126. Shope, R.E. 1964. Porcine contagious pneumonia. I. Experimental transmission, etiology and pathology. *J. Exp. Med.* 119: 357-368.
 127. Sidibe, M; S. Messier; S. Lariviere; M. Gottschalk y K.R. Mittal.1993.Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the Porcine Upper Respiratory Tract as a Complement to Serological Tests.*Can J Vet Res.* 57: 204-208.
 128. Sirois, M.; E. G. Lemire y R. C. Levesque. 1991. Construction of a DNA probe and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by using Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29: 1183-1187.
 129. Sjölund, M.; M. Zoric; M. Persson y P. Wallgren. 2004. Maternal protection to infections caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* effects of the immune status of the dam. Proceedings of the 18th IPVS Congress.1:409.
 130. Somchit, A.; P. Assavacheep; W. Neramitmansook; y A. Sailasuta. 2004. Peracute infection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 in guinea pigs.*Thai J. Vet. Med.* 34(1):21-28.
 131. Stark, K.D.C. 2000. Epidemiological investigation of the influence of environmental risk factors on respiratory diseases in swine. A literature review. *The Veterinary Journal*, 159:37-56.
 132. Stenbaek, E.I.; y A.L. Schirmer. 1994. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 antibodies in pig sera by an inhibition enzyme immuno assay (EIA). *Vet. Microbiol.* 39, 231–344.

133. Tascón, R.I ; J A. Vázquez-Boland; CB. Gutiérrez; I. Rodríguez-Barbosa, E.F Rodríguez .1994. The RTX haemolysins ApxI and ApxII are major virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*: evidence from mutational analysis. *Mol. Microbiol.* 14(2):207-216.
134. Tascón, R. I; J.A. Vázquez-Boland; C. B. Gutiérrez; J. I. Rodríguez-Barbosa y E.F Rodríguez.1997. *Actinobacillus pleuropneumoniae* does not require urease activity to produce acute swine pleuropneumonia. *FEMS Microbiol. Lett.*148: 53-57.
135. Taylor, D.J. 1999.*Actinobacillus pleuropneumoniae*.En: Straw, B.E.; D’Allaire, S.; Mengeling, W.L.; Taylor, D.J. 8^{va} Ed.Diseases of swine. Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A., p.343-354.
136. Thacker, B. y Thacker, E. 2000. The PRDC battle continues. *Pig Progress, Special Respiratory Diseases IV*. Junio. 16-18.
137. Torremorell, M.; C. Pijoan; K. Janni; R. Walker; H.S. Joo.1997.Airborne transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nursery pigs. *Am. J. Vet. Res.*58 (8):828-32.
138. Torres, MIP.; SD. Bruguera; SA. Sedano; JG. Maldonado; DV. Llopart. 2006. Serotype distribution of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in The Philippines. *Proceedings of the 19th IPVS Congress*. 2:239.
139. Utrera, V. y S. del Castillo.2006.Pleuropneumonia porcina. Un enemigo fácil de derrotar?
Acceso:http://www.engormix.com/s_articles_view.asp?art=1314&AREA=POR-165
140. Utrera, V.; A. Gallardo de López; L. Mariño. 1989. Serotipificación De *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*. *Veterinaria Tropical*.13:1-8.

141. Van den Bosch, J.F.; A.M.M.A. Pennings; M.E.C.M.Cuijpers; A.N.B. Pubben; F.G.A. van Vugt y M.F.I. van der Linden.1992. Heterologous Protection Induced by an *Actinobacillus pleuropneumoniae* Subunit Vaccine.*Proceedings IPVS*. p.11.
142. Van Overbeke, I.; K. Chiers; E. Donne; R. Ducatelle; F. Haesebrouck. 2003. Effect of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10 of pigs vaccinated with bacterins consisting of *A. pleuropneumoniae* serotype 10 grown under NAD-rich and NAD-restricted conditions. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public. Health*. 50(6):289-93.
143. Vaz, C S. L. 2002. Genotipificação de amostras sorotificáveis e não sorotificáveis de *Actinobacillus. pleuropneumoniae* através de RAPD. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.
144. Vigre, H.; A. Oystein; K. Barfod; D. Lavritsen; V. Sorensen. 2002. Transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs under field-like conditions: emphasis on tonsillar colonization and passively acquired colostral antibodies. *Vet Microbiol*.89:151-159.
145. Vigre, H.; A.K. Ersboll; V. Sorensen. 2003. Decay of acquired colostral antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*.50 (9):430-5.
146. Williams J. J.; M. Torres-León; P. Echeverria-Coello; M. Matos-Medina. 2000. Aislamiento e identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en pulmones de cerdos con pleuroneumonía crónica sacrificados en el rastro municipal de Mérida, Yucatán, México.*Rev Biomed*. 11:175-181.

147. Wongnarkpet, S.; D.U. Pfeiffer; R.S. Morris; S.G. Fenwick.1999. An on-farm study of the epidemiology of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs as part of a vaccine efficacy trial.*Preventive Veterinary Medicine*. 39:1-11.
148. Zhang, Y.; J.M. Tennent ; A.Ingham ; G. Beddome; C. Prideaux y W.P Michalski. 2000. Identification of type 4 frimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 189: 15-18.
149. Zielinski, G. 2006. Infecciones por *Actinobacillus pleuropneumoniae*: situación en Argentina.Memorias del V Congreso de Producción Porcina del MERCOSUR-Argentina.
150. Zielinski, G ; A. Estévez ; M. Ruffo. 2006. Dinámica de la infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (app) en una granja sin sintomatología clínica. Memorias del V Congreso de Producción Porcina del MERCOSUR-Argentina.